

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Marina Kipson

**TOKSIKODINAMIKA PROMETRINA U KRVI MIŠA**

Diplomski rad

Zagreb, 2009. godina

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### TOKSIKODINAMIKA PROMETRINA U KRVI MIŠA

Marina Kipson

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

#### Sažetak

Prometrin spada u skupinu triazinskih herbicida (s-triazina), jednu od najčešće upotrebljavanih skupina herbicida koji su postojali u tlu i vodenom sedimentu. Cilj istraživanja je bio pratiti toksikodinamiku herbicida prometrina u krvi miševa (*in vivo*) kroz vremenski period od 24h. Miševima je prometrin apliciran oralno, a za utvrđivanje koncentracije prometrina u uzorcima krvi korištena je metoda vezanog sustava plinske kromatografije-spektrometrije masa (GCMS). Prometrin je zabilježen u svim promatranim vremenskim razmacima tijekom 24 sata sa relativno niskom koncentracijom u krvi miševa u odnosu na ukupnu unesenu dozu. Rezultati pokazuju da postoje razlike između mužjaka i ženki u koncentraciji prometrina sve do četvrtog sata nakon oralnog unosa prometrina. Nakon četvrtog sata razlika više nije statistički značajna te je koncentracija prometrina u krvi podjednaka i u muškom i u ženskom organizmu. Iako prometrin nakon 24h ostaje u krvi u niskim koncentracijama, to ukazuje na činjenicu da se u potpunosti ne eliminira i ima potencijal postepenog nakupljanja u organizmu.

(40 stranica, 21 slika, 6 tablica, 49 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici  
Ključne riječi: prometrin, toksikodinamika, krv, triazin  
Voditelj: Dr. Oskar Springer, redoviti profesor  
Ocjenitelji: Dr.sc. Mirjana Kalafatić, redoviti profesor; Dr.sc. Božena Mitić, docent  
Rad prihvaćen: 08.04.2009.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation thesis

### TOKSICODYNAMICS OF PROMETRYNE IN MICE BLOOD

Marina Kipson

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

#### Abstract

Prometryne is a member of triazine herbicide group (s-triazines) which make one of the most common herbicide groups and are persistent in soil and water sediment. The aim of this study was to describe toxicodynamics of prometryne in the mice blood (*in vivo*) during 24 hour time-period. Mice were given a single acute dose *per os* and the detection of prometryne blood concentration was done with gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) method. Prometryne was detected in all analyzed times over 24 hours with relatively low percentage in contrast to the entry dose. Results indicate a significant statistical difference between sexes until the 4th hour from prometryne oral entry. After 4th hour the concentration of prometryne in male and female mice becomes equal and it is no longer statistically significant. Although prometryne is detected with low concentrations after 24 hours, this shows that it is not completely eliminated from the organism and might build up and increase in total blood concentration.

(40 pages, 21 figures, 6 tables, 49 references, original in: Croatian)

Thesis deposit in Central biological library

Key words: prometryne, toxicodynamic, blood, triazine

Supervisor: Dr. Oskar Springer, Professor

Reviewers: Dr.sc. Mirjana Kalafati , Professor; Dr.sc. Božena Miti , Assistant Professor

Thesis accepted: 08.04.2009.

## **SADRŽAJ**

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1.1. HERBICIDI	2
1.2. TRIAZINI	3
1.2.1. PROMETRIN	5
1.3. FARMAKO(TOKSIKO)KINETI KI PARAMETRI	8
1.3.1. OSNOVNI KINETI KI PARAMETRI	9
1.4. KRV I NJENA ULOGA U DISTRIBUCIJI KSENOBIOTIKA KROZ ORGANIZAM	11
1.4.1. KRVNA PLAZMA	11
1.4.2. KRVNE STANICE	13
<b>2. MATERIJALI I METODE</b>	<b>16</b>
2.1. POKUSNE ŽIVOTINJE	16
2.2. PLAN POKUSA I NA IN APLIKACIJE ISPITIVANOG HERBICIDA PROMETRINA	16
2.3. ODRE IVANJE TJELESNE TEŽINE POKUSNIH ŽIVOTINJA	17
2.4. RAZUDBA ŽIVOTINJA I UZIMANJE KRVI	17
2.5. KVANTITATIVNO ODRE IVANJE PRISUTNOSTI PROMETRINA U UZORCIMA KRVI	17
2.5.1. KEMIČALIJE	17
2.5.2. OTOPINE	18
2.6. PLINSKA KROMATOLOGRAFIJA	18
2.7. MASENA SPEKTROMETRIJA	19
2.8. OPREMA	20
2.8.1. EKSTRAKCIJA PROMETRINA IZ UZORAKA KRVI	21
2.8.2. ODRE IVANJE KONCENTRACIJE PROMETRINA U UZORCIMA KRVI	21
2.8.3. PROVJERA GC/MS METODE	22
2.9. STATISTI KA OBRADA PODATAKA	22
<b>3. REZULTATI</b>	<b>23</b>
3.1. KONCENTRACIJA PROMETRINA U KRVI	23
3.1.2. PROMJENE KONCENTRACIJE PROMETRINA S OBZIROM NA VRIJEME	32
<b>4. RASPRAVA</b>	<b>34</b>
<b>5. ZAKLJU AK</b>	<b>36</b>
<b>6. LITERATURA</b>	<b>37</b>

## KRATICE

LD50 (Median lethal dose) - doza toksične supstance potrebna da ubije 50 % testirane populacije

LADME (Liberation, Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) – kinetičke faze ksenobiotika u organizmu (oslobađanje, apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija)

AUC (Area under curve) – područje ispod koncentracijsko-vremenske krivulje

GCMS (Gas chromatography - mass spectrometry) – vezani sustav plinske kromatografije-spektrometrije masa

## ZAHVALA

Zahvaljujem dr. Oskaru P. Springeru na mentorstvu i stručnom vodstvu prilikom izrade ovog rada.

Veliko hvala dr.sc. Domagoju Šikiću na osmišljenom pokusu i velikoj pomoći prilikom usmjeravanja u samom diplomskom radu.

Zahvaljujem mr.sc. Lani Sajli, dipl. ing. Mariji Majer i Gordani Žakman za pomoć pri provođenju eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Mami, tati i Karolini zahvaljujem na podršci koju su mi pružali i vjerovali u mene.

Cijeloj šišmiš sekciji, popularnoj zvanoj „Croatian terrorist organization“, želim zahvaliti za brojne hladne i tople noći provedene uz beskrajne razgovore ispod mreža. I za provođenje „cute & cuddly“ taktike gdje god je to bilo moguće. Sanja, Norma, Jasna, Dina, Darija, Vida i Ana hvala vam!

Za kraj bih voljela zahvaliti svim svojim prijateljicama bez kojih studiranje, tereni, putovanja, tulum, a ni učenje ne bi bili ni upola zabavni kao što su bili. Kad god sam s vama nije bitno da li smo na planini, ljetovanju, van svake civilizacije ili u oblaku kiše jer je uvijek jednako inspirirajuće, produktivno i zabavno. I nadam se da će tako uvijek i biti. Hvala Tamari, Željki, Antici, Miji, Martinko, Petri, Zubici i Mariji za sve dosadašnje i buduće pustolovine!

## 1. UVOD

Svakodnevni porast broja svjetskog stanovništva uvjetuje potrebu za povećanom proizvodnjom hrane. U današnjoj prehrambenoj industriji taj cilj se postiže optimiziranjem okolišnih uvjeta koji obuhvaćaju procese od genske pripreme sjemena koje se koristi za usjeve, do razvoja, žetve i skladištenja konačnih proizvoda (PRC 2008). Jedna od uсталih metoda u intenziviranju proizvodnje je primjena pesticida, koju uzgajivači koriste za sprečavanje rasta korovnog bilja u usjevu ili uništavanje insekata. Pesticidom se smatra bilo koja kemikalija koja se koristi da ubije ili kontrolira populaciju neželjenih gljivica, životinja ili biljaka koji uzrokuju smanjene prinose usjeva (Enger i Smith 2002). Veliki dio pesticida su herbicidi, skupina organskih i anorganskih spojeva koji sprečavaju rast biljaka, posebno korovnog bilja (McGraw-Hill Encyclopedia of Science and Technology).

Neprikladna uporaba herbicida može negativno utjecati na usjev, uzrokovati štetu u okolišu te predstavlja prijetnju osobi koja ih upotrebljava i ostalim organizmima koji su izloženi određenoj kemikaliji. Razumijevanje na koji herbicid djeluje daje uvid u pravilnu upotrebu kemikalija i pomaže u dijagnosticiranju uzrokovanih problema i popravljanju štete (Peterson i sur. 2001). Europski parlament i Vijeće su prihvaćanjem Šestog okolišnog akcijskog programa prepoznali utjecaj pesticida na ljudsko zdravlje i okoliš, posebice od strane produkata koji služe za zaštitu biljaka te potrebu za njihovim daljnjim reduciranjem (Muthmann i Nadin 2007).

Prometrin spada u skupinu herbicida triazina (s-triazini) koji su jedna od najčešće upotrebljavanih grupa herbicida (Berg i sur. 1995, Böcher i sur. 1994, Wallace-Hayes i sur. 2001). S-triazini su kemikalije koje su postojane u tlu i vodenom sedimentu, vrijeme poluraspada najčešće je i do nekoliko mjeseci. Uzrok tomu je njihova slaba topivost u vodi i jak afinitet vezanja za materijale od ugljika i glinu (Ayele i sur. 1996). Te fizikalno kemijske osobine su važne pri analizi okolišne i toksikološke problematike iz razloga što se te tvari bioakumuliraju kroz hranidbeni lanac, pogotovo u voću, uljastim tvarima u biljkama ali i mlijeku mesu i životinjskim masnoćama, te tako dolaze do čovjeka kao krajnjeg konzumenta (Galvin i sur. 2002).

Uz bilo koje strane tvari (ksenobiotika) na tijelo čovjeka ili životinje ovise o farmakodinamici i farmakokinetici samih svojstvima te tvari. Farmakodinamika se bavi procesima i mehanizmima aktivnosti koju uzrokuje sama tvar, i stoga opisuje što ta supstanca radi tijelu. Farmakokinetika se bavi promjenama koncentracije tvari u tijelu kroz vremensko

razdoblje, što je uzrokovano apsorpcijom, distribucijom i eliminacijom te tvari. Toksikokinetika (u bilo kojem obliku) je esencijalno bazirana na principima farmakokinetike koja se primjenjuje na bilo koji ksenobiotik, bilo da je to tvar koja se koristi u terapijske svrhe ili toksikant (Fichtl 1999).

**Cilj istraživanja** je bio pratiti toksikodinamiku herbicida prometrina u krvi miševa (*in vivo*) kroz vremenski period od 24h. Zbog nedovoljne istraženosti utjecaja prometrina na organske sustave sisavaca bilo je potrebno provesti pokus na modelnim organizmima, miševima. Promatrane su promjene koncentracija prometrina u krvi nakon različitih vremenskih razmaka te vrijeme koje je potrebno za izlazak tog spoja iz krvi miševa. Kod ljudi su mjerenja koncentracije tvari do velikih mjera ograničena na određivanje koncentracije u krvi ili plazmi i u ekskretu, kao što su urin i feces. Iz toga je razloga ekstrapolacija procjene rizika otrovnosti pojedinog pesticida moguće a jedino upotrebom laboratorijskih životinja ili drugih vrsta organizama. Rangiranje farmakokinetičkih parametara od životinja do čovjeka od velike važnosti u razvoju farmacije i toksikologije.

## 1.1. HERBICIDI

Herbicidi su kemikalije koje inhibiraju ili ometaju normalan rast biljaka. U širokoj su upotrebi u poljoprivredi, industriji i urbanim područjima za kontrolu korovnog bilja (Peterson i sur. 2001). Herbicidi čine oko 60 posto od otprilike 440 milijuna kilograma pesticida korištenih u agrikulturi Sjedinjenih američkih država (Enger i Smith 2002). U Republici Hrvatskoj od ukupne količine svih pesticida prema djelatnim tvarima najzastupljeniji su herbicidi (34,8% ili 96 djelatnih tvari; Glasilo biljne zaštite, broj 2-3, 2005).

Herbicidi se mogu podijeliti s obzirom na kemijske, fizikalne i biološko-fiziološke osobine i svojstva (Springer i Springer 2008):

Prema učinku najčešće se dijele na:

- totalne (uništavaju sve biljne vrste) i
- selektivne (uništavaju samo određene biljne vrste)

Prema načinu i mjestu djelovanja mogu biti:

- kontaktnog djelovanja (djeluju u neposrednom kontaktu s biljkom i uništavaju biljne dijelove s kojima su u dodiru)



- translokacijskog djelovanja (apsorbiraju se i prenose u razne biljne organe dalje od mjesta ulaska i izazivaju njihovo odumiranje)

Prema toksičnosti za životinje i čovjeka (testirano na standardnim laboratorijskim životinjama) najčešće se dijele na:

- skupina I – LD 50 < 50 mg/kg
- skupina II – LD 50 50-250 mg/kg
- skupina III – LD 50 250-1000 mg/kg
- skupina IV – LD 50 > 1000-5000 mg/kg

S obzirom na njihovu stabilnost u okolišu možemo ih označiti kao:

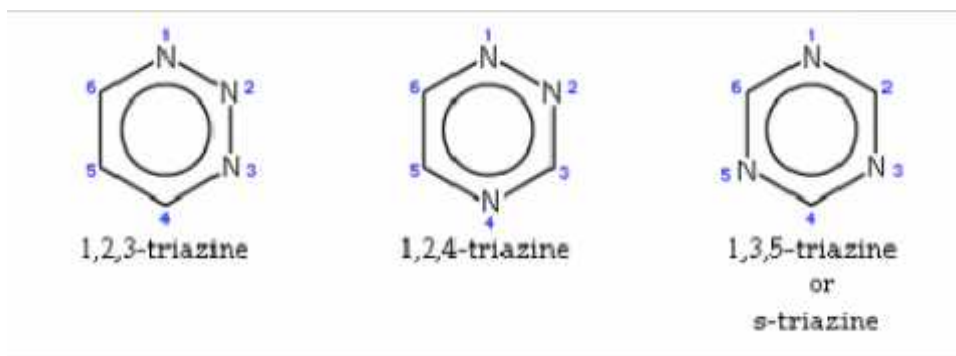
- vrlo stabilni herbicidi (vrijeme razlaganja duže od 2 godine)
- stabilni herbicidi (vrijeme razlaganja od 6 mjeseci do 2 godine)
- umjereno stabilni herbicidi (vrijeme razlaganja 1 do 6 mjeseci) i
- slabo stabilni herbicidi (vrijeme razlaganja kraće od 1 mjeseca)

S obzirom na kemijsku strukturu dijelimo ih na:

- karbonske kiseline i njene derivate
- ariloksialilkarbonske kiseline i njene derivate
- derivate karbaminske kiseline
- derivati tio i ditiokarbaminske kiseline
- derivate karbamida
- derivati dipiridila
- nitrofenoli, nitroanilini i njihovi derivati
- heterocikli koji spojevi s dva atoma dušika u prstenu (diazini)
- heterocikli koji spojevi s tri atoma dušika u prstenu (triazini)

## 1.2. TRIAZINI

Triazini su izomeri 3 organske kemikalije sa empirijskom formulom  $C_3H_3N_3$  (Slika 1). Struktura triazina je heterociklički prsten analogan benzenu, ali sa tri dušika koji zamjenjuju ugljik.



**Slika 1. Strukturne formule triazina**

Simetri ni triazini se mogu podijeliti u 3 skupine (Evgenidou i sur. 2007):

- kloro-,
- metoksi- i
- metiltiotriazine

Triazini se koriste kao selektivni herbicidi primjenjuju i se prije i nakon klijanja biljaka na usjevima kao što je kukuruz, je am, še erna trska, ananas kao i u o uvanju šuma (Hayes i Laws 1991). ine skupinu toksi nih i postojanih herbicida u vodi, biljkama i životinjama. Topivost u vodi varira od 5 do 750 ng/L, ali može biti izmjenjena vrijednostima pH (za ionizabilne grupe), temperaturom ili prisutnoš u otopljenih soli i organskih estica (Navarro i sur. 2004). Triazinski herbicidi (atrazin, simazin i sencor) su aktivniji i perzistentniji kod viših pH ( preko 7.0) nego kod nižih pH (Peterson i sur. 2001).

U zadnja tri desetlje a ove tvari predstavljaju drugu najve u grupu herbicida po upotrebi u U.S. (NRC 1987.). Ti herbicidi se apsorbiraju korijenjem i korjenovim dla icama te se u biljci prenose samo ksilemom (Peterson i sur. 2001). Ovi herbicidi blokiraju odre ene reakcije nužne za fotosintezu, proces proizvodnje hrane u biljkama (Ashton i Crafts 1973). U skladu s njihovom upotrebom rasla je i zabrinutost javnosti o mogu im utjecajima tih polutanata na ljudsko zdravlje i okoliš (Hodgson i Lefi 1996). Iz tog razloga Hörmann i sur., su ve 1976 godine istraživali ostatke triazinskih herbicida u mnogim tokovima centralne Europe (Hörmann i sur. 1979).

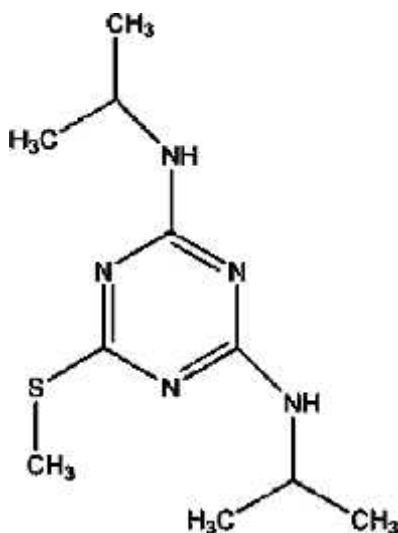
Triazinski herbicidi inili su ve inu u kontroli korova u konvencionalnom sistemu EU te bi pod trenutnim EU usmjerenjima njihova upotreba trebala biti povu ena (PSD 2003).

U Republici Hrvatskoj ukupno je u 2004.g. proizvedeno 3.840 t sredstava za zaštitu bilja (AZZO 2005). Me utim, pouzdanih podataka o potrošnji sredstava za zaštitu bilja nema.

Procjenjuje se da potrošnja sredstava za zaštitu bilja na obradivim površinama iznosi od 2,5 do 3kg aktivne tvari po hektaru tla po godini (AZZO 2005).

### 1.2.1. PROMETRIN

**Prometrin** (Slika 2) je metil-tio-S-triazinski spoj, molekulske formule:  $C_{10}H_{19}N_5S$  (*N,N'*-Bis (1-metiletil)-6-(metiltio)-1,3,5-triazine-2,4-diamine), sinonim: 2,4-bis (izopropilamino)-6-(metiltio)-S-triazin) (iki 2006).



Slika 2. Strukturna formula prometrina

Prometrin je u uporabi kao selektivni sistemni herbicid kod suzbijanja jednogodišnjih širokolisnih korova te se primjenjuje u usjevima soje, suncokreta, mrkve, krumpira, graška, graha i peršina (Herbos 2007). U Hrvatskoj je prometrin registriran kao djelatna tvar u sljedećim proizvodima: Gesagard 500 FL, Prohelan-t i Prometrex 50 SC (Gospodarski list 2007). S obzirom da hrvatski propisi vezani za problematiku herbicida nisu bili usklađeni s europskim (Direktiva 91/414 EEC), Vlada je donijela novi Zakon o sredstvima za zaštitu bilja (NN 70/05), kojim se propisuje novi postupak registracije sredstava, jednak onom koji vrijedi u svim državama članicama EU-a (Gospodarski list, 2007). U skladu s novim propisima dozvola za primjenu prometrina istječe 01.07.2007. te se u razdoblju od 01.07.2007. do 01.01.2008. dozvoljava samo prodaja preostalih zaliha, a njihova primjena se dopušta do 01.01.2009. (Zakon o sredstvima za zaštitu bilja Nn 70/05). Međutim iako je zabrana korištenja prometrina stupila na snagu, zbog njegovih bioakumulacijskih i

bioperzistentnih svojstava važno je i nadalje provoditi istraživanja o njegovim ekotoksikološkim osobinama.

Prometrin je dobro topiv u mastima i organskim otapalima (iki 2006). S obzirom na otrovnost za životinjske organizme svrstan je u skupinu II ili III, ovisno o formulaciji (Glasnik zaštite bilja 2000, Kamrin i sur. 2000, iki 2006). Triazini pripadaju malo otrovnim pesticidima. Vrijednosti LD<sub>50</sub> oralno za štakora za neke od triazina su prikazane u tablici 1 (iki 2006).

**Tablica 1. LD<sub>50</sub> oralne vrijednosti za štakora**

triazin	LD <sub>50</sub> oralno štakor (mg/kg)
ametrin	964
atrazin	3080
cijanazin	334
prometrin	3750
simazin	5000
propazin	> 5000

S obzirom na klasifikaciju prometrina, K<sub>oc</sub> vrijednosti (311-614) ukazuju da ima umjerenu do nisku mobilnost u tlu i sposobnost adsorpcije na suspendirane estice i sediment u vodi (Swann i sur. 1983, Cao i sur. 2007). Prometrin je esto detektiran u podzemnim i površinskim vodama te ak i u mlijeku dojilja (Albanis i sur. 1994, Balduini i sur. 2003, Papadopoulou-Mourkidou i sur. 2004). Kemijska stabilnost prometrina omogu uje mu da prodire polako kroz tlo uzrokuju i dugotrajnu kontaminaciju podzemnih resursa vode (Evgenidou i sur. 2007).

Europska unija je donijela legislativu prema kojoj su postavljene maksimalne rezidualne vrijednosti herbicida u vodi namijenjenoj za ljudsku upotrebu (Hu i sur., 2007). EU direktiva 98/83/EC govori da razina pesticida ne smije premašiti granicu od 0.1µg/L za pojedini herbicid i neke od njihovih degradacijskih produkata te 0.5µg/L za njihovu ukupnu koli inu u vodi (Evgenidou i sur. 2007).

U studiji koju su proveli Vida ek i sur. u razdoblju od 1992. do 1997. na pokusnim poljima u slivu Karašica-Vu ica prometrin je detektiran u jednom uzorku tla sa koncentracijom 35 ng/g tla (Vida ek i sur. 1994).

Triazini se razgra uju oksidativnom fotolizom i mikrobiološkom aktivnoš u u tlu (Galvin i sur. 2001). Studije utjecaja na mikroorganizme okoliša ukazuju da prometrin ne

predstavlja ekotoksi nu noksu koja bi u ve oj mjeri mogla narušiti populacijsku ravnotežu pojedinih komponenti mikroflore tla koja bi uzrokovala ve e promjene u ekosustavu ( iki 2006). U studiji koju su proveli Bezuglov i sur. amonificiraju e bakterije i gljive, aktinomiceti i denitrifikacijske bakterije pokazale su se neosjetljive na sve testirane pesticide, uklju uju i i prometrin (Bezuglov i sur. 1976).

Akutni eksperiment koji je proveden na štakorima tretiranim s 50 ppm prometrina ili terbutina po kilogramu tjelesne težine kroz 15 dana otkrio je varijacije u sintezi T3, T4 i LH tipova stanica. Pokazano je da i prometrin i terbutin stimuliraju T3 sintezu i inhibiraju T4 sintezu (Ghinea i sur. 1980).

Istraživana je toksi nost dvaju herbicida Miedzina 50 i Gesadarda 50 na punoglavce žabe, vrste *Rana temporaria*. Gesagard 50 (prometrin) se pokazao toksi nijim i pod njegovim utjecajem opažene su jake degenerativne promjene u probavi i mozgu. Tako er su zabilježeni i poreme aji u razvoju punoglavaca koji su uklju ivali djelomi nu inhibiciju rasta i retardaciju procesa stvaranja operkuluma u usporedbi sa kontrolnim životinjama (Jordan i sur. 1977)

Nizom pokusa, brojni autori pokazali su da prometrin jako djeluje na endokrine funkcije odnosno da djeluje kao endokrini ometa (engleski pojam: *endocrine disruptor*) ( iki 2006). Martynyuk i sur. u svom pokusu istražuju reproduktivnu toksi nost (faza I testova teratogenosti i reprodukcije) koja uklju uje analizu sposobnosti plodnosti i za e a nakon aplikacije prometrina. Pokazalo se da pri dnevnoj aplikaciji doza 5 mg/kg tijekom tri mjeseca, spareni mužjaci i ženke štakora mogu dati potomstvo dok tretmanom dozama od 50 mg/kg tijekom 6 mjeseci sparene životinje nisu dale potomstvo (Martynyuk i sur. 1970).

Neke studije pokazuju da prometrin ima jak gonadotoksi an u inak ( iki 2006). Kod muških albino štakora koji su bili dnevno tretirani 20-kratno s dozom 1/20 LD 50 prometrina nastale su velike citološke alteracije u sjemenim kanali ima. Tako er je dokazano da utje e i na morfologiju jezgre spermija, na osobine primanja boja citoplazmatske RNA i afinitet pironina za citoplazmu (Shtabskiy i sur. 1976).

Štakori tretirani 6 mjeseci dnevnim dozama od 50 mg/kg imali su morfološke promjene u strukturi krvnih stanica uz poja anu sedimentaciju eritrocita (SE) i redukciju protrombinskog indeksa. S dnevnom dozom od 5 mg/kg apliciranu tijekom 3 mjeseca primjena je samo leukocitoza i redukcija protrombinskog indeksa (Martynyuk i sur. 1970). Gzhegotskii (1968) izvještava o u incima akutnog i kroni nog izlaganja prometrinu na perifernu krv štakora. Akutno izlaganje rezultiralo je u smanjenjem broja leukocita i limfocita, te porastom eozinofila, neutrofila i monocita. Brzina koagulacije je pove ana (592 sekundi u akutno otrovanih životinja naprama 866 sekundi u kontrolnoj skupini). Ove promjene bile su

još ja e izražene 10 i 12 sati nakon izlaganja u životinja koje su preživjele akutnu dozu. Životinje u pokusu kroni ne izloženosti 50 mg/kg imale su iste promjene. Nakon etiri i šest mjeseci razvila se hipokromna anemija ( iki 2006).

Prvi slu aj akutnog trovanja prometrinom kod ljudi je zabilježen u Sloveniji gdje je 62 godišnjak pokušao samoubojstvo uzevši 50g prometrina i etanol. Sedam sati nakon trovanja laboratorijski testovi su pokazali metaboli ku acidozu s izra unatim anionskim padom od 47.5 mmol/L i laktata od 23.4 mmol/L. Hemodijalizom su popravljani metaboli ki nesrazmjeri, ali se nije snizila koncentraciju prometrina u serumu (Brvar i sur. 2008).

### **1.3. FARMAKO(TOKSIKO)KINETI KI PARAMETRI**

Ako se neka lijekovita ili otrovna tvar unosi kao dio smjese, prvo se mora osloboditi iz smjese. Ako se ne unosi direktno u cirkulaciju, tvar se mora apsorbirati sa apsorpcijskog mjesta u krvotok. Nakon ulaska u sistemska cirkulaciju, supstanca se distribuira kroz krvotok do pojedinih tkiva gdje dostiže svoje mjesto aktivnosti. Do odre ene mjere, ve ina supstanci se reverzno vežu za proteine u plazmi, ili konstituente u tkivu. Supstanca se može razgraditi metabolizmom (biotransformacija) i na kraju se izlu i iz tkiva. Tijekom procesa apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije, tvar prolazi kroz biološke membrane ve inom pasivnom difuzijom. Prema Fickovom zakonu, brzina difuzije je direktno proporcionalna koncentracijskom gradijentu na membrani. Nadalje, prolazak ovisi i o topljivosti te supstance u lipidima. Za tvar koja se ionizira, topljivost u lipidima ovisi o njenoj pK vrijednosti i pH tjelesnih teku ina. Osnovni kineti ki parametri koji opisuju apsorpciju, distribuciju, metabolizam i ekskreciju su biodostupnost, volumen distribucije i uklanjanje (eliminacija).

Kineti ki parametri koji opisuju promjene koncentracije tvari s vremenom su poluživot, prostor ispod koncentracijsko-vremenske krivulje te maksimalna i minimalna koncentracija u plazmi. Kineti ke faze i parametri prikazani su slikom 3 (LADME shema).

Kineti ka faza		Kineti ki parametar
Osloba anje (Liberation)	}	Biodostupnost
Apsorpcija (Absorption)		
Distribucija (Distribution)		Volumen distribucije
Metabolizam (Metabolism)	}	Eliminacija
Ekskrecija (Excretion)		

**Slika 3. LADME shema (preuzeto iz Fichtl 1999)**

### 1.3.1.OSNOVNI KINETI KI PARAMETRI

#### **Volumen distribucije**

Volumen distribucije povezuje ukupnu količinu tvari u tijelu sa koncentracijom u plazmi. Kao parametar koji povezuje količinu (mg) sa koncentracijom (mg/l) ima dimenziju volumena, uobičajeno u litrama, ili kad se odnosi na tjelesnu težinu, u litrama po kilogramu.

Ovisno o svojstvima tvari da prolazi kapilarne stijenke i stani ne membrane u tijelu postoje 3 glavna mjesta distribucije: plazma, izvanstanični volumen (plazma i intersticijska tekućina) i ukupna voda u tijelu (plazma, međustanična tekućina i intersticijska tekućina). Većina tvari se ne distribuira jednoliko po tijelu. Ako se velika količina pohrani u tkivu ili masti, dana doza će rezultirati mnogo manjom koncentracijom u plazmi nego ako se tvar distribuira samo u vodi. Većina tvari se veže za proteine plazme.

#### **Uklanjanje**

Uklanjanje je mjera sposobnosti organizma da eliminira određenu stranu tvar (ksenobiotik). Termin eliminacija podrazumijeva stvarno odstranjivanje supstance ekskrecijom i njenu pretvorbu metabolizmom. Glavni putevi ekskrecije za nepromijenjene supstance su izlučivanje bubrezima u urin, sekrecija u žuči sa prolaskom kroz crijeva i ekskrecija u feces te izdah iz pluća. Sa kinetičkog gledišta tvar se također eliminira kad se promijeni u nešto drugo (metabolit), iako metaboliti još mogu biti prisutni u tijelu. Metabolizam se prvenstveno događa u jetri, ali i drugi organi su sposobni za metaboliziranje stranih komponenti.

Uklanjanje se može objasniti kao volumen plazme (ili neke druge referentne tekućine) koji se po jedinici vremena oslobađa supstance.

### **Metaboli i uklanjanje**

Metabolizam tvari ili biotransformacija je drugi važan put eliminacije. Reakcije su obično podijeljene u 2 faze. Reakcije faze I uključuju oksidaciju, redukciju i hidrolizu. Reakcije faze I mogu i povećati i smanjiti biološku aktivnost komponenti. Neaktivne komponente mogu biti transformirane u aktivne. U reakcijama faze II, koje se još nazivaju i reakcijama sinteze, endogena supstanca je prihvaćena za roditeljsku supstancu ili metabolit faze I. Primjeri reakcija faze II su konjugacije komponenti sa glukuronskom kiselinom, sulfatom, acetatom, metilnim skupinama i glicinom.

Lipofilne tvari se ne mogu efikasno ukloniti bubrezima. Mnoge reakcije biotransformacije smanjuju lipofilnost tih komponenti. Polarne metabolite je moguće izlučiti bubrežnim ili nekim drugim putem (Springer i Springer 2008).

Ukupno uklanjanje supstance je moguće odrediti samo iz vremenskog tijeka koncentracija u plazmi bez da se uzorkuju sva potencijalna mjesta eliminacije. Kad se koncentracije u plazmi prikažu kroz vrijeme moguće je izračunati područje ispod koncentracijsko-vremenske krivulje (AUC). Veličina AUC-a (od nule do beskonačno) ovisi o količini tvari koja je ušla u tijelo i većini doze i rezultirati višim koncentracijama. Važno je shvatiti da je AUC ovisan o uklanjanju. Ako se tvar polako uklanja iz tijela, zabilježiti će se veće koncentracije nego ako se tvar eliminira brzo.

### **Biodostupnost**

U slučaju da se tvar unese direktno u krvotok cijela doza ulazi u cirkulaciju i dostupna je za distribuciju po cijelom tijelu. Sljedeći i druge puteve aplikacije, toksikant mora biti apsorbiran da bi došao u opću cirkulaciju. Brzina i razmjor apsorpcije ovise o sposobnosti tvari da prolazi kroz biološke membrane te su pod utjecajem brzine i količine supstance koja se otapa i oslobađa iz produkta. Ekstrakcija tvari iz krvi može biti toliko ekstenzivna da se većina tvari ukloni iz krvotoka prilikom prvog prolaza kroz jetru (efekt prvog prolaza).

Biodostupnost je termin koji se upotrebljava za brzinu i razmjor u kojoj supstanca postaje dostupna nakon oslobađanja, apsorpcije i eliminacijskog prvog prolaza i kao takav



obuhvaća i širi pojam od apsorpcije. Općenito se odnosi na frakciju unesene doze koja ulazi u opću cirkulaciju.

### **Razlike vrsta u kinetici**

Prave kvalitativne razlike u farmakodinamici (toksikodinamici) nisu jako istaknute među vrstama sisavaca. Osnovna anatomska struktura, osnovna fiziologija i glavni biološki putevi su slični među vrstama. Važna iznimka je biotransformacija stranih tvari. Razlike među vrstama se mogu očitovati ne samo u metabolizmu tvari već i u bilo kojoj fazi LADME sheme.

## **1.4. KRV I NJENA ULOGA U DISTRIBUCIJI KSENOBIOTIKA KROZ ORGANIZAM**

Krv je kompleksno vezivno tkivo koje cirkulira tijelom i sastoji se od suspendiranih stanica u tekućem matriksu. Funkcija cirkulacije je zadovoljavanje tkivnih potreba (Guyton i Hall 2003) :

- prijenos hranjivih tvari,
- odnošenje otpadnih proizvoda,
- prijenos hormona iz jednog dijela tijela u drugi,
- održavanje prikladne okoline u svim tjelesnim tekućinama potrebne za optimalno preživljavanje i funkciju stanica

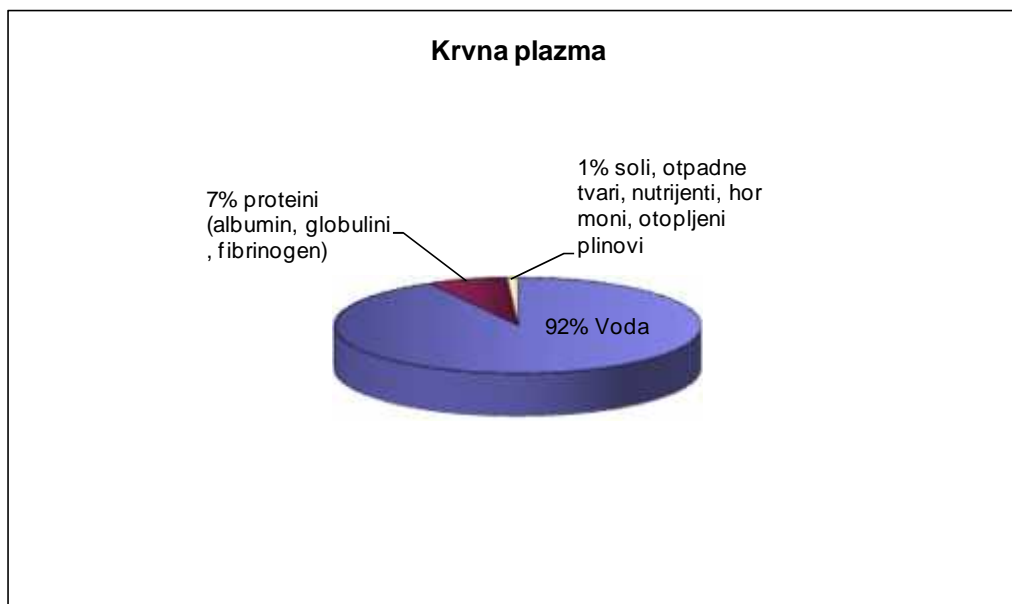
### **1.4.1. KRVNA PLAZMA**

Matriks krvi je tekućina plazma, koja sadrži mnoge suspendirane ili otopljene biomolekule (Lewis i sur. 2004). Plazma je nestanični dio krvi i u ljudi čini 1/4 ukupne izvanstanične tekućine, odnosno oko 3 L (Guyton i Hall 2003). Sastav je plazme, koja zauzima više od polovice krvnog volumena, 90-92% voda (Slika 4). Sadrži 7-8% otopljenih proteina od više od 70 različitih tipova. Neki, kao albumin, održavaju osmotski tlak. Globulini omogućuju imunosni odgovor, a neki proteini plazme prenose lipide ili metale, uključujući i cink, željezo i bakar. Veliki plazmin protein, fibrinogen, igra ključnu ulogu u zgrušavanju krvi. Otprilike 1% plazme se sastoji od drugih otopljenih molekula, uključujući i soli,

nutrijente, vitamine, hormone, metaboli ke otpade i plinove. Iako su koncentracije ovih otopljenih tvari male, one su kriti ne, što zna i da i najmanje narušavanje homeostaske ravnotežne koncentracije tih tvari u krvi dovodi do patofizioloških promjena u organizmu. (Lewis i sur. 2004) .

Kad se tvar unese direktno u krv ili apsorbira sa mjesta unosa, prvo ulazi u plazmu. Iz plazme može u i u krvne stanice ili se distribuirati preko krvotoka do razli itih tkiva. Koncentracija u vodi plazme (nevezana, slobodna koncentracija) je ona koja je ekvivalentna sa koncentracijom na aktivnom mjestu (Fichtl 1999).

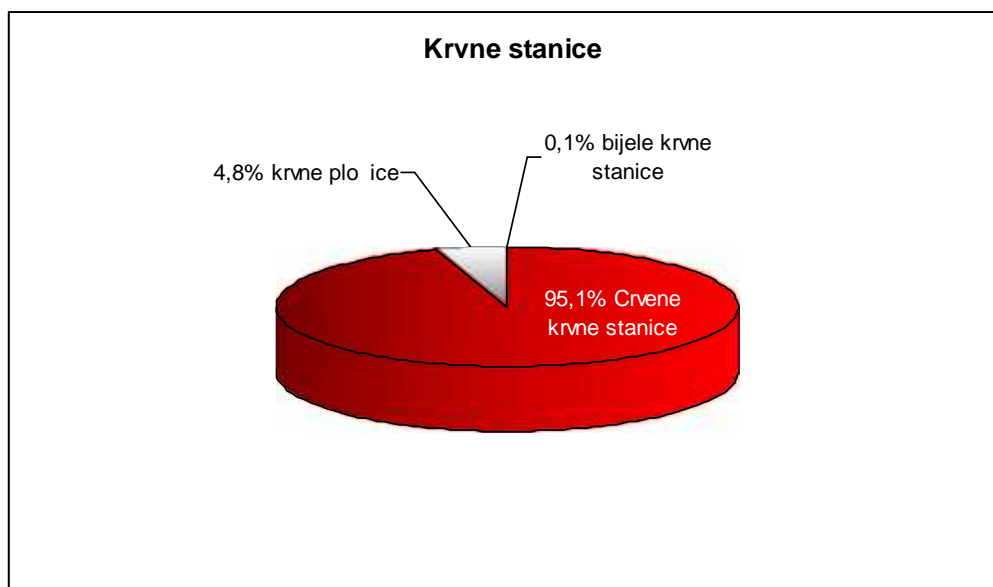
Kroz pore u kapilarnim membranama, plazma je neprekidno u vezi s me ustani nom teku inom. Te su pore vrlo propusne za ve inu tvari otopljenih u izvanstani noj teku ini, osim za bjelan evine. Dakle, izvanstani ne teku ine se neprekidno miješaju, pa plazma i me ustani na teku ina imaju skoro isti sastav, osim što je plazmatska koncentracija bjelan evina ve a (Guyton. i Hall 2003). Krv sadrži obje teku ine, izvanstani nu (teku inu plazme) i stani nu (teku inu u eritrocitima). No obi no se krv smatra zasebnim odjeljkom tjelesnih teku ina jer se nalazi unutar vlastitog zatvorenog podru ja, tj. cirkulacijskog sustava. (Guyton i Hall 2003).



**Slika 4. Sastav krvne plazme (Lewis i sur. 2004)**

#### 1.4.2. KRVNE STANICE

Krvne stanice ili stani ni fragmenti ine vrste elemente krvi (Lewis i sur. 2004). Tri tipa stanica su crvene krvne stanice (eritrociti), bijele krvne stanice (leukociti) i krvne plo ice (trombociti). Kubi ni milimetar krvi normalno sadrži oko 5 milijuna crvenih krvnih stanica, 7000 bijelih krvnih stanica i 250000 krvnih plo ica (Slika 5).



Slika 5. Brojnost pojedinih tipova krvnih stanica (Lewis i sur. 2004)

#### **Crvene krvne stanice (eritrociti)**

Crvene krvne stanice su daleko najbrojnije u plazmi. Njihov prekursor se stvara unutar crvene koštane srži brzinom od 2 do 3 milijuna po sekundi. Kako se razvijaju ljudske crvene krvne stanice gube jezgru, ribosome i mitohondrije. Zrele crvene krvne stanice kojima nedostaje jezgra se ne mogu dijeliti ili izvoditi ve inu stani nog metabolizma. Imaju, me utim, mnogo glikoliti kih enzima koji omogu uju ATP za izvedbu njihovih funkcija. (Lewis i sur. 2004). Ti enzimi služe i za:

- 1) održavanje gipkosti membrane,
- 2) za prijenos iona kroz membranu,
- 3) za održavanje željeza u stani nom hemoglobinu u fero-obliku, a ne u feri-obliku (feri-željezo uzrokuje stvaranje methemoglobina koji ne prenosi kisik),
- 4) za spre avanje oksidacije bjelan evina u eritrocitima.

Unato tome, vremenom ti metabolički procesi u eritrocitima slabe, pa oni postupno postaju sve krhki, vjerojatno zato što se njihovi životni procesi jednostavno istroše (Guyton i Hall 2003).

Zrele krvne stanice su bikonkavni diskovi koji sadrže hemoglobin. Tijekom njenog životnog vijeka, od 120 dana, crvena krvna stanica prolazi kroz arterije i ulazi u kapilare. Naposljetku, stanica se uništava u jetri ili slezeni, i većina se njenih komponenti reciklira.

Oblik i sastav crvenih krvnih stanica su prilagođeni transportu kisika. Tanka, lako savitljiva stanica se može progurati kroz uske prolaze, a njen bikonkavni oblik povećava površinsko područje za izmjenu plinova. Zajednička površina svih crvenih krvnih stanica u ljudskom tijelu je otprilike 2000 puta veća od vanjske površine tijela. (Lewis i sur. 2004).

Osim prijenosa hemoglobina, eritrociti imaju još neke funkcije. Primjerice, sadrže veliku količinu enzima karboanhidraze, koja katalizira reverzibilnu reakciju između ugljikova dioksida i vode, ubrzavaju i tu reakciju više tisuć puta. Osim toga, hemoglobin u eritrocitima je izvrstan acidobazni pufer (kao i većina bjelancevina), pa su eritrociti odgovorni za većinu acidobazne puferске moći krvi (Guyton i Hall 2003).

Broj crvenih krvnih stanica u krvi prilagođava se okolišnim uvjetima. Na višim nadmorskim visinama, gdje je razina kisika manja, povećava se broj eritrocita da bi se osigurala adekvatna opskrba tkiva kisikom (Lewis i sur. 2004).

### **Bijele krvne stanice (leukociti)**

Bijele krvne stanice su veće od crvenih i zadržavaju svoju jezgru. Tipovi bijelih krvnih stanica se razlikuju veličinom, životnim vijekom, smještaju u tijelu, oblikom jezgre, brojem granula u citoplazmi i svojstvima bojenja (Lewis i sur. 2004).

Da bi spriječio bolesti, sve te stanice djeluju zajedno, i to na 2 različita načina (Guyton i Hall 2003):

- 1) izravnim razaranjem bakterija i virusa fagocitozom i
- 2) stvaranjem protutijela i senzibiliziranih limfocita, koji, pojedinačno ili zajedno, mogu uništiti ili inaktivirati napadača.

U krvi postoji 6 različitih vrsta leukocita. To su polimorfonuklearni : neutrofili, eozinofili, bazofili; monociti i limfociti i, kadkada, plazma-stanice. Polimorfonuklearni leukociti su zrnastog oblika zbog čega se nazivaju granulociti (Guyton i Hall 2003).

Granulociti i monociti štite organizam od uzročnika zaraza ponajprije fagocitozom, tj. proždiranjem tih uzročnika. Limfociti i plazma stanice djeluju uglavnom s imunološkim sustavom. (Guyton i Hall 2003).

Granulociti i monociti nastaju samo u koštanoj srži. Limfociti i plazma-stanice se stvaraju u različitim limfatičnim tkivima, među koje pripadaju limfne žlijezde, slezena, prsna žlijezda (timus), krajnici i nakupine limfatičnog tkiva na drugim mjestima u organizmu, posebice u koštanoj srži i u tzv. Peyerovim pločama koje se nalaze ispod crijeвне stijenke. Leukociti koji nastaju u koštanoj srži pohranjuju se u srži sve dok ne zatrebaju u cirkulacijskom sustavu. Glavni je razlog nazočnosti leukocita u krvi njihov prijenos iz koštane srži ili limfatičnog tkiva u tjelesna područja u kojima zatrebaju.

### **Krvne pločice (trombociti)**

U sisavaca krvne pločice su mali, bezbojni stanični fragmenti promjera 1 do 4  $\mu\text{m}$  koji traju oko 1 tjedan i uzrokuju zgrušavanje krvi.

Nastaju u koštanoj srži iz megakariocita, vrlo velikih stanica hematopoetskog reda. (Guyton i Hall 2003). Ova gigantska stanica ima redove vezikula koje dijele citoplazmu u različite regije. Vezikule se povećavaju i spoje, «odbacuju i» fragmente koji postaju krvne pločice. U zdravom sustavu pločice cirkuliraju slobodno kroz žile (Lewis i sur. 2004). Premda trombociti nemaju jezgru i ne mogu se dijeliti, oni ipak imaju mnoga funkcionalna svojstva cjelovite stanice.

Važna je i stanična stijenka trombocita. Na njezinoj je površini glikoproteinski omotač koji sprečava prijanjanje membrane uz normalni endotel, ali uzrokuje njeno prijanjanje uz oštećena područja stijenke krvne žile, napose uz oštećene endotelne stanice, i još više, uz kolagen koji potječe iz dubljih dijelova žilne stijenke (Guyton i Hall 2003)

Ali ako se žila ošteti ili njena unutrašnjost ozlijedi, pločice se zalijepe na mjesto ozljede, raspršuju i se i otpuštaju i biomolekule iz sekretornih granula. Ove biomolekule zajedno sa proteinima plazme započinju kompleks serijskih reakcija koji rezultiraju zgrušavanjem krvi (Lewis i sur. 2004).

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. POKUSNE ŽIVOTINJE

Pokus je proveden na singeni nim miševima soja CBA T6T6, uzgojenima u uzgajalištu laboratorijskih životinja Zavoda za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno-matemati kog fakulteta, Sveu ilišta u Zagrebu. Životinje korištene za pokus bile su u dobi od  $60 \pm 5$  dana u trenutku apliciranja herbicida. Životinje su oko ene i uzgojene u standardnim uvjetima propisanim za uzgoj laboratorijskih životinja (glodavaca), odnosno pri temperaturi od 25°C, dnevnom ritmu svjetla i tame 12/12 sati, s ponu enom hranom i vodom *ad libitum*.

Kontrolne i tretirane životinje držane su pod istim uvjetima. Životinje su, nasumi nim uzorkovanjem raspore ene u pet skupina, sa po dvije podskupine s obzirom na spol životinja. U svakoj je skupini bilo dvanaest životinja, odnosno šest u podskupini (m-mužjaci, ž-ženke) (Frankovi 1990, Thiruchelvam i sur. 2000, Ulm 1994, Wallace-Hayes 2001, Williams 1999). Svakom mišu unutar podskupine pridružen je broj od 1 do 6. Tako je svaka jedinka dobila jedinstvenu šifru s obzirom na raspored u pokusu.

Ovakvo ozna avanje omogu ilo je pra enje pojedinih jedinki tijekom itavog pokusa i podjelu skupina prema pripadaju im dozama:

K= kontrolna skupina = 0 mg/kg prometrina,

S1h, S2h, S4h, S8h i S24h= skupine koje su primile 1000 mg/kg prometrina i nakon odgovaraju eg vremena žrtvovane. Priložene oznake su dodane zbog lakšeg ozna avanja, uz vrijeme koje je proteklo od kaniliranja do žrtvovanja:

### 2.2. PLAN POKUSA I NA IN APLIKACIJE ISPITIVANOG HERBICIDA PROMETRINA

Za potrebe pra enja toksikodinamike prometrina u krvi proveden je test akutne toksi nosti.

Doza ispitivanog herbicida prometrina u pokusu je iznosila 1/3 LD<sub>50</sub> doze. Prometrin je životinjama apliciran gastri kom kanilom, *per os*, u ukupnom volumenu od 0.5 ml. Praškasti tehni ki prometrin (95%) je suspendiran u vodi na potrebni volumen planirane doze. Kontrolna skupina dobila je jednak volumen vode bez prometrina. Ovakav na in aplikacije najbolje simulira ekspoziciju organizama okolišno prisutnom prometrinu.

### **2.3. ODREĐIVANJE TJELESNE TEŽINE POKUSNIH ŽIVOTINJA**

Tjelesna težina životinja je određena prije aplikacije herbicida na digitalnoj elektroničkoj vagi Sartorius koja važe s točnošću od  $\pm 0,01$  g.

### **2.4. RAZUDBA ŽIVOTINJA I UZIMANJE KRVI**

Svaka grupa miševa bila je nakon odgovarajućeg vremena žrtvovana. Svaka jedinka je narkotizirana i odmah potom joj je iz pazušne arterije uzeta krv Pasteurovom cjevicom navlaženom heparinom, da bi se spriječila zgrušavanje krvi. Krv je usisana i spremljena u ependorf – epruvete od 2 mL. Uzorci krvi odmah nakon uzimanja su pohranjeni u zamrzivač. Nakon uzimanja krvi žrtvovanoj jedinki je izvađen mozak.

### **2.5. KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE PRISUTNOSTI PROMETRINA U UZORCIMA KRVI**

Nakon žrtvovanja i razudbe tretiranih životinja uzorci krvi su analizirani radi utvrđivanja koncentracije prometrina metodom vezanog sustava plinske kromatografije-spektrometrije masa (GCMS).

#### **2.5.1 KEMIČKE**

1. standard - prometrin (isto kao 99,5 %, Dr. Ehrenstorfen GmbH, Njemačka)
2. interni standard – atrazin (isto kao 99,5 %, Dr. Ehrenstorfen GmbH, Njemačka)
3. aceton (isto kao 99,8 %, Merck, Njemačka)
4. n-heksan (isto kao 99,8 %, Merck, Njemačka)
5. etilacetat (isto kao 99,8 %, Merck, Njemačka)
6. diklormetan (isto kao 99,8 %, Merck, Njemačka)
7. natrij-volftamat-2-hidrat ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (isto kao p.a., Kemika, Hrvatska)

## 2.5.2. OTOPINE

### Otopina internog standarda

Pripremljena je izvorna otopina atrazina 3,5mg/mL u acetonu i dalje razrijeđena deioniziranom vodom do 3500ng/mL.

### Standardni uzorak krvi

Za potrebe baždarnog pravca pripremljeno je deset koncentracije prometina od 10 do 2000 ng/mL na sljedeći način:

1. pripremljena je izvorna otopina prometina u acetonu koncentracije 1mg/mL i dalje je razrijeđena do željenih ng/mL koncentracija u deioniziranoj vodi.
2. netretirani uzorci krvi su prethodno analizirani GCMS metodom kako bi se utvrdilo da ne sadrže tragove analiziranog herbicida prometina te atrazina koji je korišten kao interni standard.
3. određeni volumeni pripremljenih otopina prometina dodavani su u netretirane uzorke pune krvi kako bi se dobile sljedeće koncentracije 10, 20, 50, 100, 150, 200, 500, 1000, 1500, 2000 ng/mL.
4. u 0.5 mL tako pripremljenog uzorka dodano je 0.2 mL otopine internog standarda.

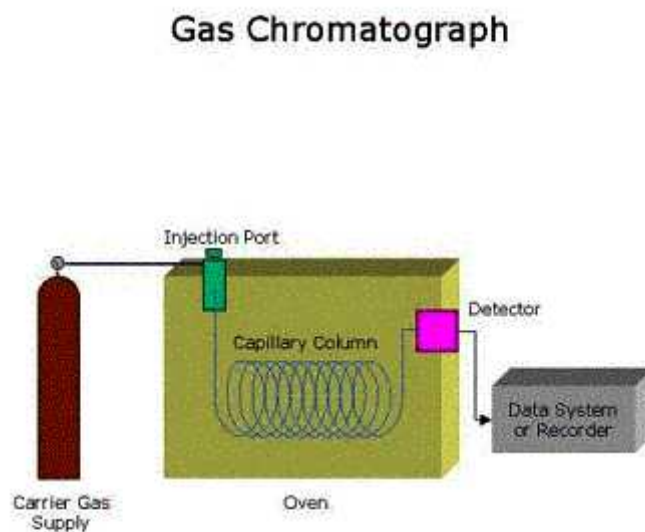
## 2.6. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Plinska kromatografija (Slika 6) je kromatografija kod koje je pokretna faza plin, a nepokretna faza tekućina ili krutina u koloni. Prema fizičko-kemijskim fenomenima na kojima se osnivaju kromatografije, plinska kromatografija je adsorpcijska (plin-krutina) ili razdjelna (plin-tekućina) kromatografija.

Plinska kromatografija je pogodna samo za analizu hlapljivih ( $M_r < 500$ ), ne suviše polarnih (dugo se zadržavaju na koloni) te termički stabilnih spojeva (radne temperature kolona su od -70 do 400 °C). Broj takvih tvari je vrlo velik (mnoge masne kiseline, aldehidi, alkoholi, amini, esteri, ketoni, ugljikovodici, halogenirani ugljikovodici, fenoli, sumporne tvari, metalni kompleksi, inertni plinovi i dr.), pa je plinska kromatografija vjerojatno najviše primjenjivani oblik kromatografije prilikom analize niza prirodnih i sintetskih spojeva.



Najčešće se kao plin nosilac upotrebljava vodik, helij, dušik, argon ili ugljik dioksid, dakle inertni plinovi visoke čistoće.



**Slika 6. Shematski prikaz plinske kromatografije**

## **2.7. MASENA SPEKTROMETRIJA**

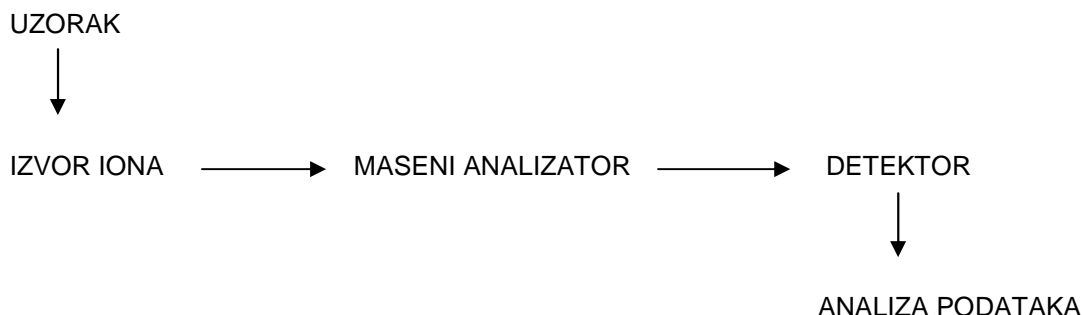
Masena spektrometrija je tehnika kojom se analiziraju molekule na temelju njihove mase (i naboja). Maseni spektrometar (Slika 7) se sastoji od 3 elementa:

- izvora iona koji razdvaja molekule uzorka u ione
- masenog analizatora koji sortira ione po masama primjenom elektromagnetskog polja
- detektora koji mjeri vrijednosti indikatorske kvantitete i tako omogućuje podatke za izradu unavanja u čistosti pojedinih iona

Prvi korak pri analizi molekula je ionizacija molekula u ionizatoru. Nastali ioni se provode kroz analizator, koji razdvaja ione u prostoru i/ili vremenu. Iz analizatora, ioni idu na detektor gdje proizvode električni signal koji se može registrirati na osciloskopu, pisaču, računaru ili na nekom drugom uređaju. Masena spektrometrija se koristi za:

- određivanje sastava nepoznatog uzorka (kvalitativna analiza)
- određivanje izotopskog sastava uzorka
- određivanje strukture molekula promatrajući fragmentaciju molekula
- određivanje molarne mase molekule

- određivanje količine određene tvari u uzorku (kvantitativna analiza)
- određivanje fizičkih i kemijskih svojstava tvari
- proučavanje ponašanja iona u vakuumu



**Slika 7. Shematski prikaz masenog spektrometra**

## **2.8. OPREMA**

Kromatografska ispitivanja provedena su na Shimadzu GCMS-QP2010S plinskom kromatografu uz primjenu detektora spektrofotometra masa (MS) i HP-5ms kapilarne kolone duljine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm, debljine filma 0,25  $\mu\text{m}$  (J&W, Agilent Technologie).

Primijenjen je temperaturni program po etne temperature 90°C tijekom 6 minuta, potom brzinom od 15°C/minuti temperatura raste do 280°C i na toj temperaturi ostaje idu ih 11 minuta

Temperatura pe i: 90°C

Temperatura injektora: 275°C

Na in injektiranja: bez odvajanja

Kontrola protoka: linearna brzina

Linerana brzina: 45,3 cm/s

Tlak: 107,2 kPa

Ukupni protok: 19,5 mL/min

Temperatura detektora: 300°C

Vrijeme trajanja metode: 30 minuta

Kvantifikacija prometina i atrazina je provedena prema njima karakterističnim omjerima mase i naboja ( $m/z$ ). Karakteristične  $m/z$  veličine za prometin je 241 a za atrazin je 200. kao potvrđni  $m/z$  brojevi za prometin su prema njima i 184 te 226 a za atrazin 215 i 58.

## 2.8.1. EKSTRAKCIJA PROMETRINA IZ UZORAKA KRVII

Prometrin je iz standardnih i stvarnih uzoraka pune krvi ekstrahiran na sljedeći način: u kivetu je dodano 0,5 mL uzorka, 0,2 mL internog standarda i 0,15 g natrij-volframata. Nakon što se natrij-volframat otopio u otopinu je dodano 2 mL smjese otapala etilacetat:diklormetan 1:3. Smjesa uzorka i otapala je miješana na vorteks mješalici 5 minuta nakon čega je 10 minuta centrifugirana brzinom od 6000 okretaja/minuti. Nakon centrifugiranja tj. razdvajanja faza uzet je 1 mL, gornjeg, organskog sloja, prebačen u staklenu bocu i uparen do suha u struji dušika. Kada se uzorak upario do suha u njega je dodan 0.1mL n-heksana te je 1  $\mu$ L takve otopine injektiran u kromatograf. Svaki uzorak je injektiran 3 puta.

## 2.8.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROMETRINA U UZORCIMA KRVII

Nakon ekstrakcije svaki pojedini standardni uzorak (u području linearnosti) injektiran je u kromatograf i računat je relativni odziv pika prometina prema piku internog standarda, za svaku pojedinu otopinu.

Koncentracija prometina u uzorcima krvi izračunata je prema jednadžbi:

$$C_x = \left[ \frac{A_x / A_{is} \text{ u nepoznatom uzorku}}{A_{rs} / A_{is} \text{ u standardnom uzorku}} \right] \cdot C_{rs}$$

gdje je

$A_x$  - površina pika analita u nepoznatom uzorku,

$A_{is}$  u nepoznatom uzorku – površina pika internog standarda u nepoznatom uzorku,

$A_{rs}$  – površina pika referentnog standarda iz standardnog uzorka,

$A_{is}$  u standardnom uzorku – površina pika internog standarda u standardnom uzorku,

$C_{rs}$  .- koncentracija analita X u referentnoj standardnoj otopini

### 2.8.3. PROVJERA GC/MS METODE

Validacija metode je provedena prema sljedećim parametrima: selektivnosti, granice kvantifikacije, linearnosti, preciznosti uz zadane kriterije prihvatljivosti.

Selektivnost je mogućnost metode da odredi željeni analit u prisutnosti komponenti uzorka u određenim uvjetima ispitivanja.

Linearnost metode je mogućnost da unutar danog područja daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Ona se određuje izradom baždarnog pravca

Granica kvantifikacije je najniža koncentracija koja se može odrediti s određenom točnošću i preciznošću a određena je uzastopnim injektiranjem (10 puta) najmanje koncentracije u području linearnosti.

Ponovljivost metode je provjerena uzastopnim injektiranjem (10 puta) tri uzoraka krvi u području linearnosti.

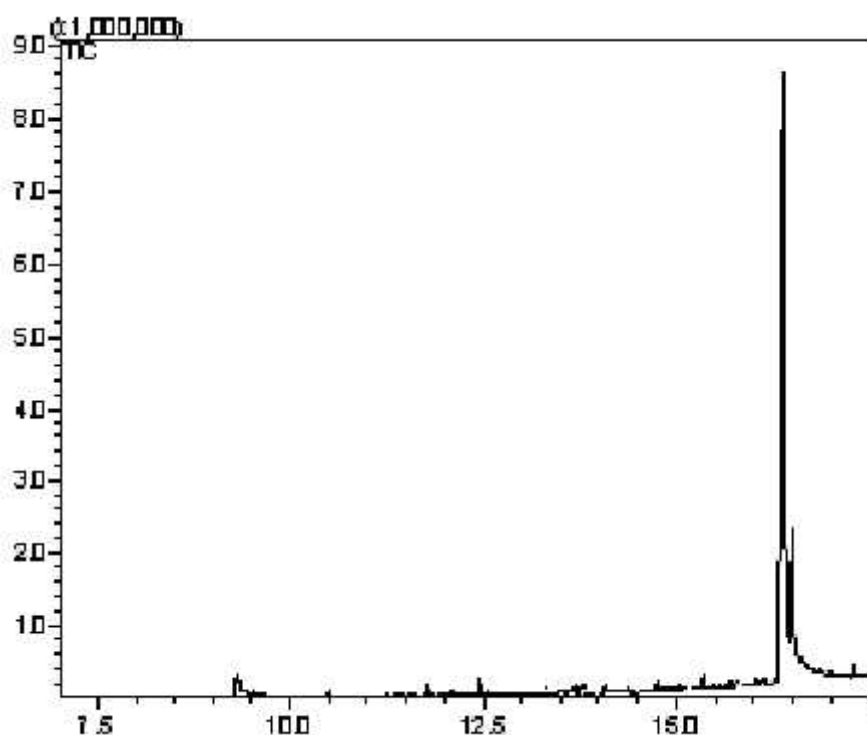
## 2.9. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada izmjerenih podataka koncentracija prometrina u krvi tretiranih životinja provedena je programom Microsoft Excel. Svaka je grupa prikazana tablicom kao srednja vrijednost ( $\pm$  standardna devijacija) i medijanom. Mjerna jedinica bila je svaka životinja zasebno odnosno svaka jedinka. Histogramom su prikazane vrijednosti prometrina u krvi po svakom triplicatu za sve skupine životinja. Odnos koncentracije i vremena prikazan je krivuljom za svaku podskupinu životinja (mužjaci i ženke) te zajedničkom krivuljom za obje podskupine.

Studentovim t-testom analizirane su spolne razlike u svakoj pojedinoj uzorkovanoj grupi. Upotrebom t-testa sparenih uzoraka za srednje vrijednosti, koji ne pretpostavlja jednake varijance u populacijama dva uzorka, određeno je koliko su njihove vrijednosti različite. Nul hipoteza korištena u testu: srednja vrijednost sparenih razlika iz dvije populacije uzoraka jednaka je nuli.

### 3. REZULTATI

Nakon žrtvovanja i razudbe tretiranih životinja uzorci krvi analizirani su radi utvrđivanja koncentracije prometrina metodom vezanog sustava plinske kromatografije-spektrometrije masa (GC-MS). Kontrolne životinje kojima je dan jednak volumen vode bez herbicida također su žrtvovane nakon pokusa te su njihovi uzorci krvi nakon razudbe analizirani na jednaki način kao i uzorci životinja koje su primile prometrin. U uzorke kontrolnih životinja nije dodavan interni standard kako bi se još jednom potvrdilo da uzorci ne sadrže prometrin ili atrazin. Slika 8 prikazuje kromatogram uzorka krvi kontrolne ženke.



Slika 8. Kromatogramski prikaz uzorka krvi kontrolne životinje

#### 3.1. KONCENTRACIJA PROMETRINA U KRVI

Nakon završetka pokusa odnosno vremena proteklog od aplikacije prometrina kod pojedinih skupina pokusne životinje su žrtvovane te nakon izuzimanja uzorci analizirani GC-MS metodom.

Izmjerene vrijednosti koncentracija prometrina u uzorcima krvi sat vremena nakon aplikacije prometrina 1g/kg tjelesne težine *per os* su deskriptivno statistički obrađene i prikazane tablicom 2. Slika 9a predstavlja grafički i numerički prikaz vrijednosti prometrina u krvi sat vremena nakon aplikacije po svakom triplikatu. Slika 9b prikazuje kromatografski prikaz (sirovi podatak) koncentracije prometrina u krvi ženke (ž1).

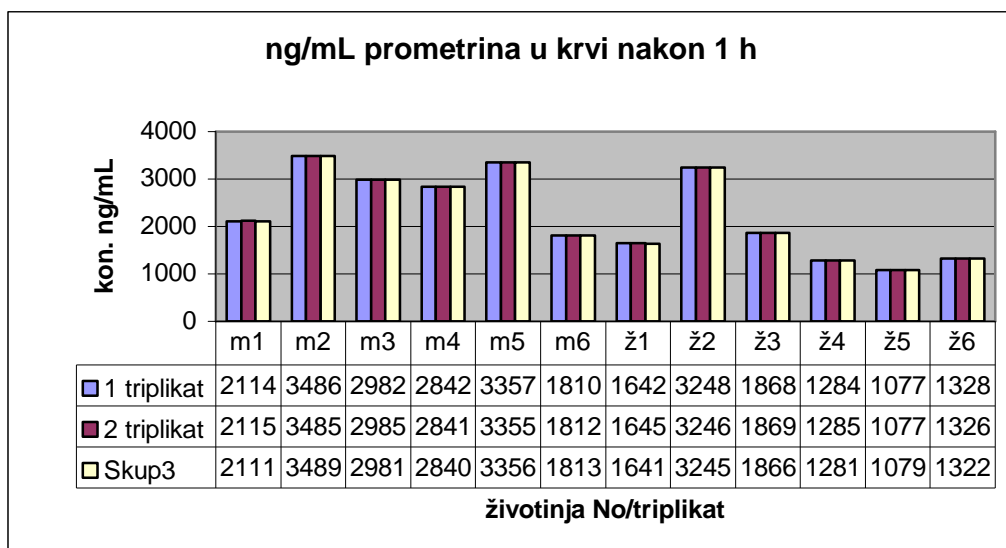
**Tablica 2. Vrijednosti koncentracije prometrina u krvi 1h nakon aplikacije (per os) herbicida**

Spol	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Median
m	2765,22 <sup>A</sup>	671,8268	2911,83
ž	1740,5 <sup>B</sup>	789,1744	1484
m + ž	2252,86	880,1297	1990,5

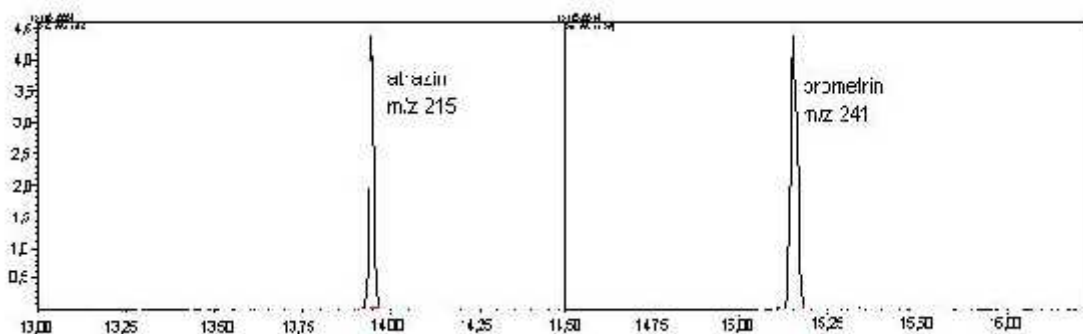
<sup>A,B</sup> razlika je statistički značajna ( $p < 0.05$ ). SD – standardna devijacija.  
m – mušjaci; ž - ženke

Izmjerena koncentracija prometrina u krvi mušjaka sat vremena nakon aplikacije iznosila je od 1811,67 do 3486,67 ng/mL. Kod mušjaka *m6* je izmjerena najniža koncentracija prometrina (1811,67 ng/mL) a kod mušjaka *m2* najviša koncentracija (3486,67 ng/mL).

Koncentracija prometrina kod ženki sat vremena nakon aplikacije herbicida iznosila je od 1077,67 do 3246,33 ng/mL. Najniža koncentracija prometrina određena je kod žene ž5 (1077,67 ng/mL) a najviša kod jedinke ž2 (3246,33 ng/mL).



**Slika 9a. Koncentracija prometrina (ng/ml) u krvi nakon 1 sata od aplikacije.**



**Slika 9b. Kromatogramski prikaz koncentracije prometrina u krvi ženke (ž1) 1 sat nakon izloženosti , RT prometrin 15,1 min , atrazin 13,9mi**

Izmjerene vrijednosti koncentracija prometrina GC-MS metodom u uzorcima krvi 2 sata nakon aplikacije prometrina 1g/kg tjelesne težine *per os* su deskriptivno statistički obrađeni što je prikazano u tablici 3. Slika 10a predstavlja grafički i numerički prikaz vrijednosti prometrina u krvi 2h nakon aplikacije po svakom triplikatu. Slika 10b prikazuje kromatografski prikaz (sirovi podatak) koncentracije prometrina u krvi ženke (ž1).

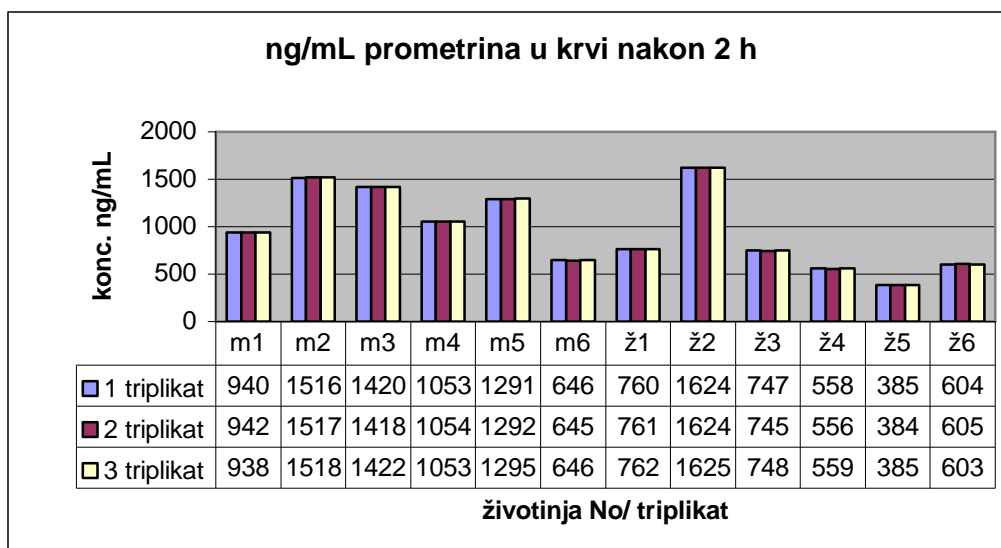
**Tablica 3. Vrijednosti koncentracije prometrina u krvi 2h nakon aplikacije (per os) herbicida**

Spol	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Median
m	1144,74 <sup>A</sup>	327,2445	1172,96
ž	779,72 <sup>B</sup>	436,1542	675,30
m + ž	962,23	414,107	850,45

<sup>A,B</sup> razlika je statistički značajna ( $p < 0.05$ ). SD – standardna devijacija.  
m – mušjaci; ž - ženke

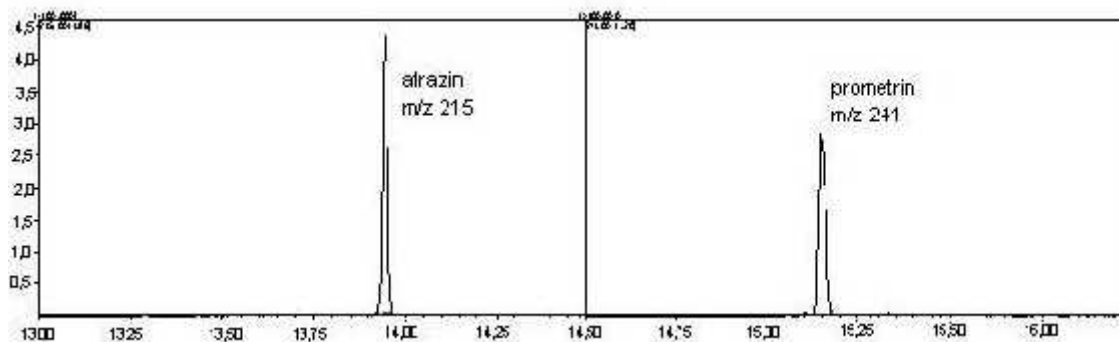
Izmjerena koncentracija prometrina u krvi mužjaka 2 sata nakon aplikacije iznosila je 645,81 do 1516,88 ng/mL. Kao i sat vremena nakon aplikacije kod mužjaka *m6* je izmjerena najniža koncentracija prometrina (645,81 ng/mL) i kod mužjaka *m2* najviša koncentracija (1516,88 ng/mL).

Koncentracija prometrina kod ženki 2 sata nakon aplikacije prometrina iznosila je od 384,55 do 1624,33 ng/mL. Najniža koncentracija prometrina određena je kod ženke *ž5* (384,55 ng/mL) a najviša kod ženke *ž2* (1624,33 ng/mL) kao i sat vremena nakon aplikacije.



**Slika 10a. Koncentracija prometrina (ng/ml) u krvi nakon 2 sata od aplikacije.**





**Slika 10b. Kromatogramski prikaz koncentracije prometrina u krvi ženke (ž1) 2 sata nakon izloženosti , RT prometrin 15,1 min , atrazin 13,9mi**

Izmjerena koncentracija prometrina GC-MS metodom u uzorcima krvi 4 sata nakon aplikacije prometrina 1g/kg tjelesne težine *per os* su deskriptivno statistički obrađeni što je prikazano u tablici 4. Slika 11a predstavlja grafički i numerički prikaz vrijednosti prometrina u krvi 4h nakon aplikacije po svakom triplikatu. Slika 11b prikazuje kromatografski prikaz (sirovi podatak) koncentracije prometrina u krvi ženke (ž1).

**Tablica 4. Vrijednosti koncentracije prometrina u krvi 4h nakon aplikacije (per os) herbicida**

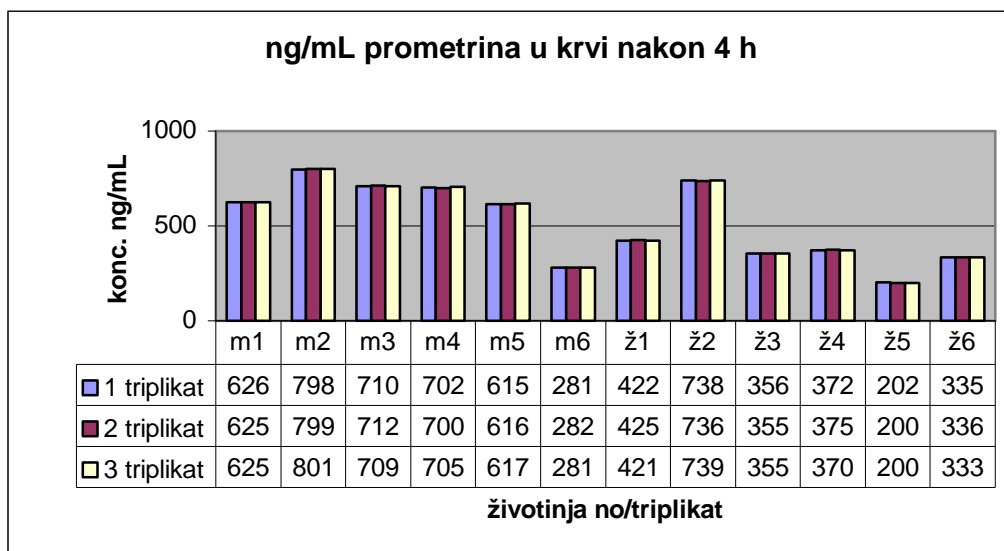
Spol	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Median
m	622,43ns	179,858	663,85
ž	403,96ns	179,5437	363,83
m + ž	513,19	205,8485	519,36

ns- razlika nije statistički značajna ( $p > 0.05$ ). SD – standardna devijacija.

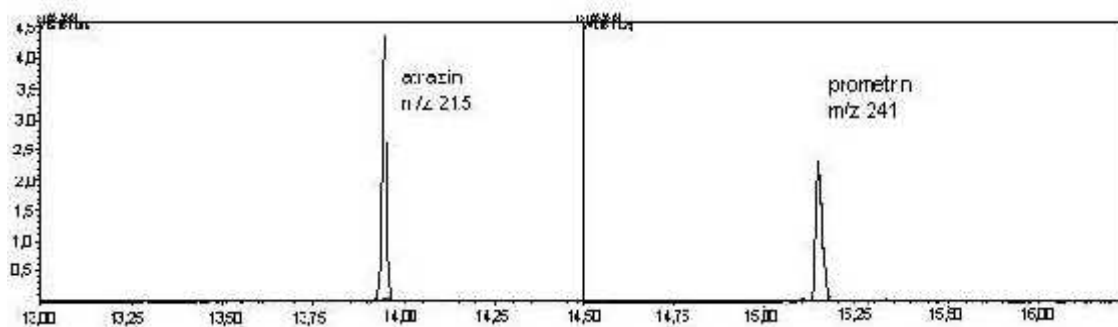
m – mušjaci; ž - ženke

Izmjerena koncentracija prometrina u krvi mužjaka 4 sata nakon aplikacije iznosila je 281,35 do 799,24 ng/mL. Najniža koncentracije 4 sata nakon aplikacije izmjerena je kod mužjaka *m6* (281,35 ng/mL) a najviša kod mužjaka *m2* (799,24 ng/mL).

Koncentracija prometrina kod ženki 4 sata nakon aplikacije herbicida iznosila je od 200,81 do 737,73 ng/mL. Najniža koncentracija prometrina određena je kod ženke ž5 (200,81 ng/mL) a najviša kod jedinke ž2 (737,73 ng/mL).



**Slika 11a. Koncentracija prometrina (ng/ml) u krvi nakon 4 sata od aplikacije.**



**Slika 11b. Kromatogramski prikaz koncentracije prometrina u krvi ženke (ž1) 4 sata nakon izloženosti , RT prometrin 15,1 min , atrazin 13,9mi**

Izmjerena koncentracija prometrina GC-MS metodom u uzorcima krvi 8 sati nakon aplikacije prometrina 1g/kg tjelesne težine *per os* su deskriptivno statistički

obra eni što je prikazano u tablici 5. Slika 12a predstavlja grafi ki i numeri ki prikaz vrijednosti prometrina u krvi sat vremena nakon aplikacije po svakom triplikatu. Slika 12b prikazuje kromatografski prikaz (sirovi podatak) koncentracije prometrina u krvi ženke (ž1).

**Tablica 5. Vrijednosti koncentracije prometrina u krvi 8h nakon aplikacije (per os) herbicida**

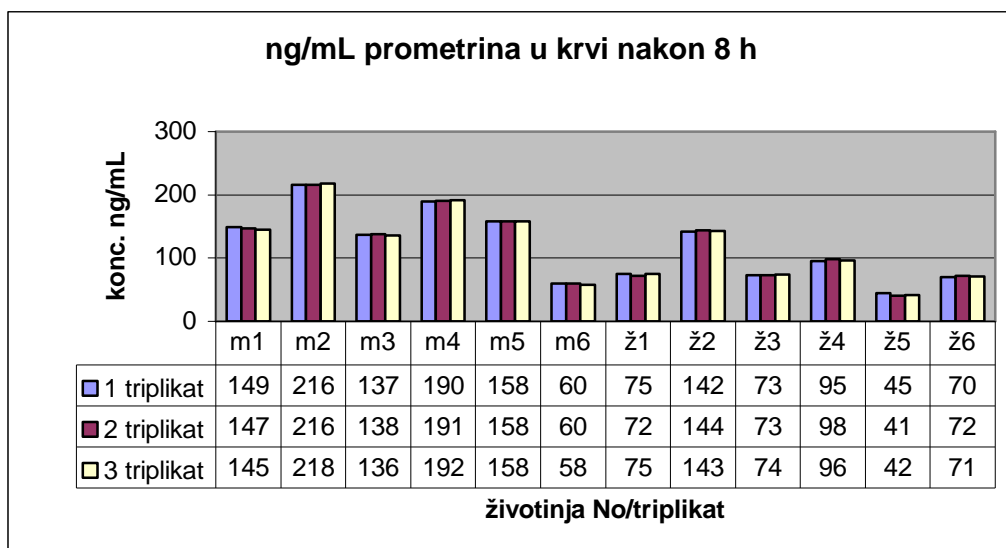
Spol	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Median
m	151,41ns	53,96652	152,46
ž	83,41ns	33,84182	73,67
m + ž	117,41	55,72905	116,66

ns- razlika nije statisti ki zna ajna ( $p > 0.05$ ). SD – standardna devijacija.

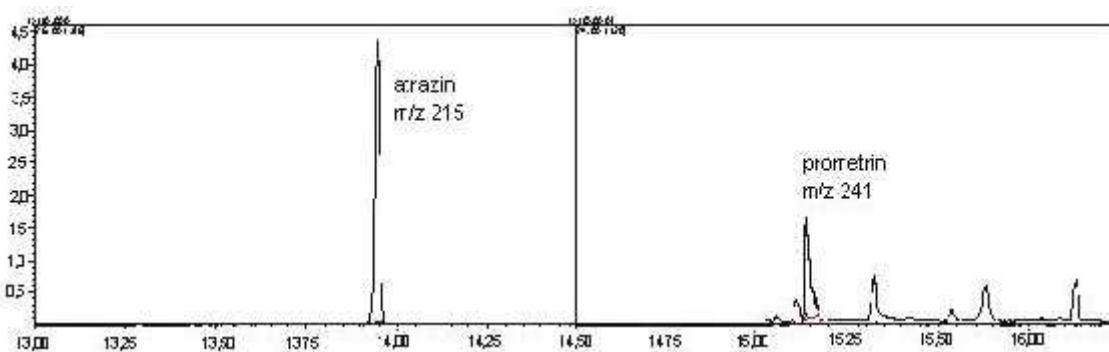
m – mužjaci; ž - ženke

Izmjerena koncentracija prometrina u krvi mužjaka 8 sati nakon aplikacije iznosila je 59,27 do 216,53 ng/mL. Najniža koncentracije 8 sati nakon aplikacije izmjerena je kod mužjaka *m6* (59,27 ng/mL) a najviša kod mužjaka *m2* (216,53 ng/mL).

Koncentracija prometrina kod ženki 8 sati nakon aplikacije herbicida iznosila je od 42,66 do 142,99 ng/mL. Najniža koncentracija prometrina odre ena je kod ženke *ž5* (42,66 ng/mL) a najviša kod jedinke *ž2* (142,99 ng/mL).



**Slika 12a. Koncentracija prometrina (ng/ml) u krvi nakon 8 sati od aplikacije.**



**Slika 12b. Kromatogramski prikaz koncentracije prometrina u krvi ženke (ž1) 8 sati nakon izloženosti , RT prometrin 15,1 min , atrazin 13,9min**

Izmjerena koncentracija prometrina GC-MS metodom u uzorcima krvi 24 sata nakon aplikacije prometrina 1g/kg tjelesne težine *per os* su deskriptivno statistički obrađeni što je prikazano u tablici 6. Slika 13a predstavlja grafički i numerički prikaz vrijednosti prometrina u krvi sat vremena nakon aplikacije po svakom triplikatu. Slika 13b prikazuje kromatografski prikaz (sirovi podatak) koncentracije prometrina u krvi ženke (ž1).

**Tablica 6. Vrijednosti koncentracije prometrina u krvi 24h nakon aplikacije (per os) herbicida**

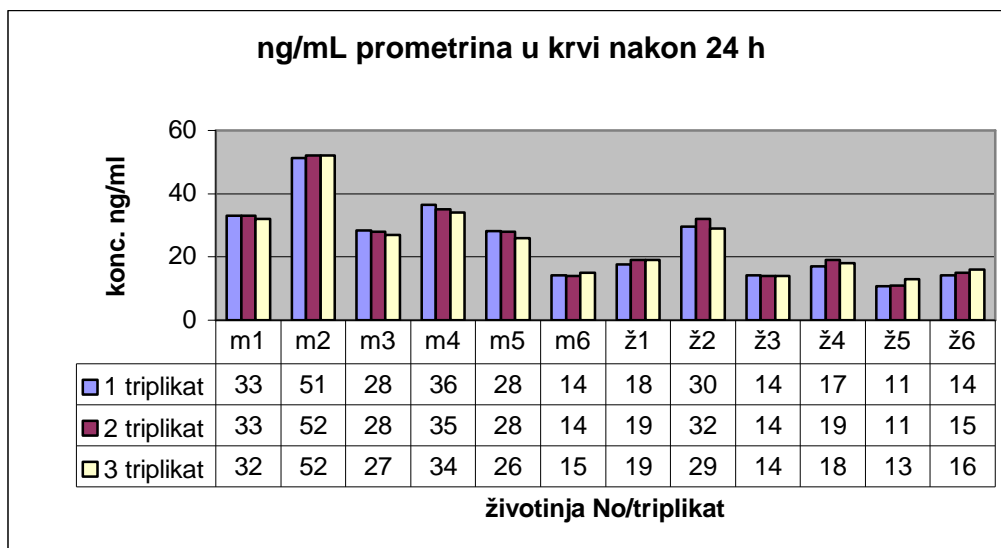
Spol	Srednja vrijednost	Standardna devijacija	Median
m	31,54ns	12,23693	30,26
ž	17,91ns	6,541946	16,55
m + ž	24,73	11,75676	22,94

ns- razlika nije statistički značajna ( $p > 0.05$ ). SD – standardna devijacija.

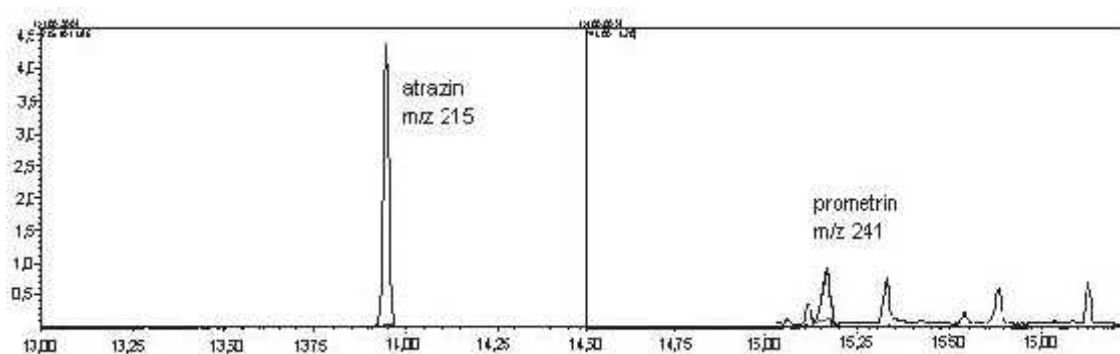
m – mužjaci; ž - ženke

Izmjerena koncentracija prometrina u krvi mužjaka 24 sata nakon aplikacije iznosila je 14,41 do 51,78 ng/mL. Najniža koncentracije 24 sata nakon aplikacije izmjerena je kod mužjaka *m2* (14,41 ng/mL) a najviša kod mužjaka *m3* (51,78 ng/mL).

Koncentracija prometrina kod ženki 24 sati nakon aplikacije herbicida iznosila je od 11,57 do 30,19 ng/mL. Najniža koncentracija prometrina određena je kod ženke *ž3* (11,57 ng/mL) a najviša kod jedinke *ž2* (30,19 ng/mL).



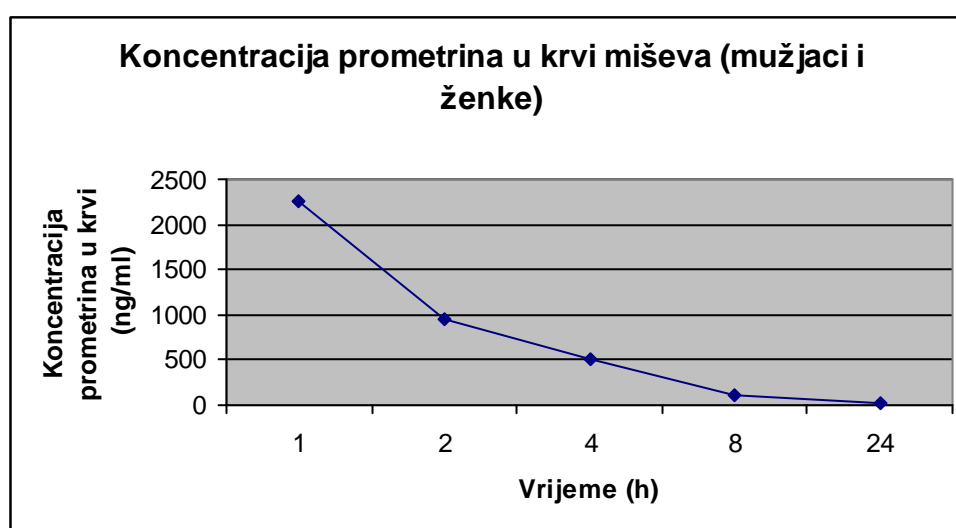
**Slika 13a. Koncentracija prometrina (ng/ml) u krvi nakon 24 sata od aplikacije.**



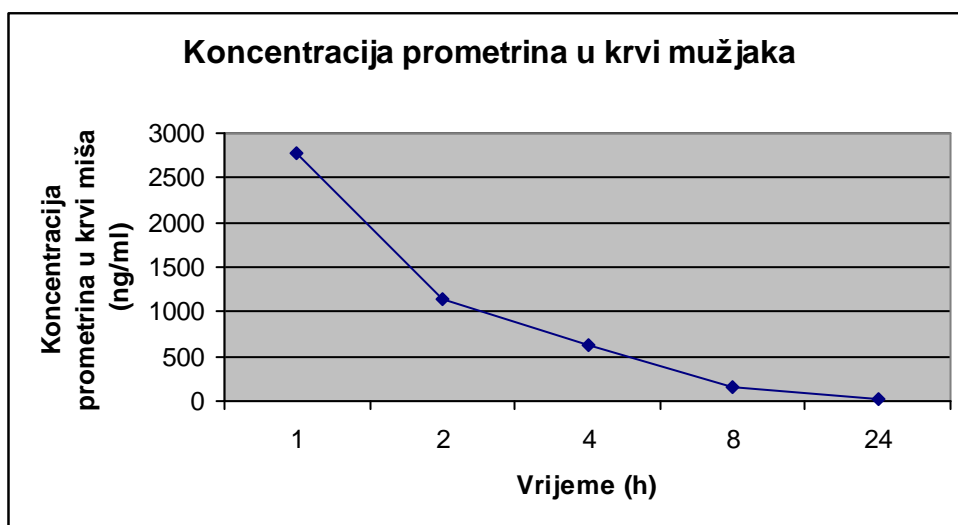
**Slika 13b. Kromatogramski prikaz koncentracije prometrina u krvi ženke (ž1) 24 sata nakon izloženosti , RT prometrin 15,1 min , atrazin 13,9min**

### 3.1.2. PROMJENE KONCENTRACIJE PROMETRINA S OBZIROM NA VRIJEME

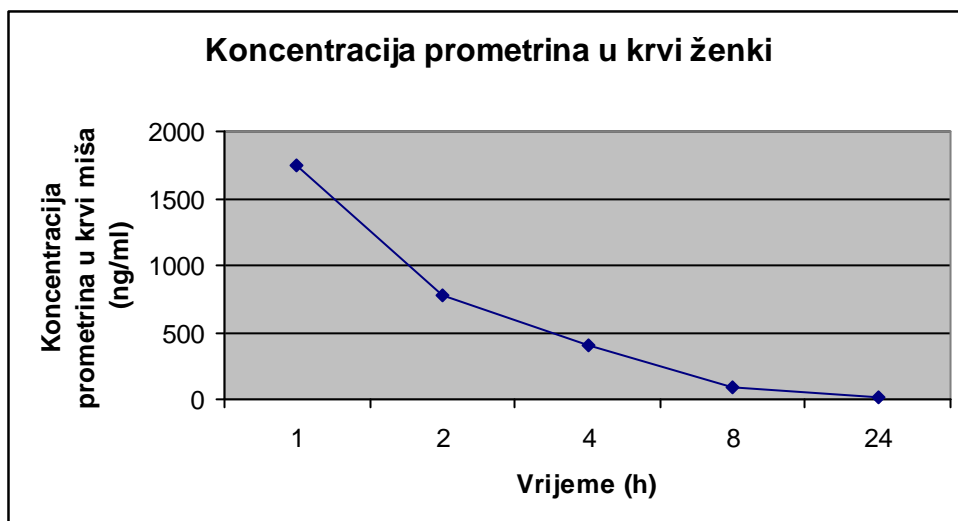
Prosje na koncentracija prometrina u krvi miševa se sukladno s o ekivanjima smanjivala s vremenom. Najviše koncentracije prometrina u krvi su zabilježene nakon 1h od aplikacije herbicida, dok su najniže koncentracije zabilježene nakon 24h od aplikacije prometrina. Koncentracijsko – vremenska krivulja grafi ki prikazuje postepeno uklanjanje prometrina iz krvi obje podskupine miševa (Slika 14), iz podskupine mužjaka (Slika 15) te iz podskupine ženki (Slika 16).



**Slika 14. Koncentracijsko – vremenska krivulja prometrina u krvi miševa**



**Slika 15. Koncentracijsko – vremenska krivulja prometrina u krvi mužjaka**



**Slika 16. Koncentracijsko – vremenska krivulja prometrina u krvi ženki**

## 4. RASPRAVA

Prijašnja istraživanja koja su se provodila na s-triazinima uglavnom su bila bazirana na istraživanju toksičnosti herbicida atrazina (Springer 2000). Manje pažnje je posvećeno prometrinu te je dosada provedeno malo pokusa koji istražuju i daju podatke o njegovoj toksičnosti i utjecaju na žive organizme. Većinom se eksperimentalni podaci vezani uz prometrin odnose na mjerenje koncentracija i vremenu zadržavanja u vodi, tlu i sedimentu (Bukvić 2006).

Oralna aplikacija prometrina u organizam miša simulirala je okolišne uvjete i dostupnost prometrina miševima u prirodi (Maynard i sur., 1999). Istraživanje koje su proveli Maynard i sur. bazirano je na metabolizmu prometrina u štakorima, dok su sli na podaci nedostajali za miševe.

U krvi miševa je nakon aplikacije prometrina tijekom 24h stalno bilježena određena koncentracija, odnosno tragovi prometrina u krvi. Prometrin je nakon 24h zabilježen sa niskom koncentracijom u krvi što upućuje na to da su procesi apsorpcije i distribucije relativno mali u odnosu na ukupnu unesenu dozu toksikanta. U pokusu Maynarda i sur. prometrin se detektira u krvi štakora i 7 dana nakon jednokratno aplicirane doze. Većina unesene doze se nakon 7 dana eliminirala putem fecesa i urina. S obzirom na količinu aplicirane doze najveći postotak prometrina (1.2-1.9 %) u svim promatranim tkivima (jetra, slezena, mišići, masno tkivo i krv) ostaje u krvi štakora bez obzira na spol životinje (Maynard i sur., 1999). U prijašnjim pokusima je takvo ponašanje sa značajnom koncentracijom u krvi zabilježeno za metiltio-s-triazinske spojeve (Hamboeck i sur., 1981). Iako prometrin nakon 24h ostaje u krvi u niskim koncentracijama, to ukazuje na činjenicu da se u potpunosti ne eliminira i ima potencijal postepenog nakupljanja u organizmu što može dovesti do povećanja koncentracije u krvi.

Rezultata ovog rada na laboratorijskom mišu, pokazuju da postoje razlike između mužjaka i ženki u koncentraciji prometrina koji je apsorbiran u krv iz probavnog sustava. Navedene koncentracije značajno su više u mužjaka, sve do četvrtog sata nakon oralnog unosa prometrina. Budući da su unesene doze bile korigirane s obzirom na tjelesnu masu odnosno ujednačene po jedinici težine po spolovima, razliku u koncentracijama možemo objasniti kao posljedicu spolom uvjetovane razlike u metabolizmu, razlike u apsorpciji i razlikom u biotransformacijskom kapacitetu pojedinog spola. Nakon četvrtog sata razlika više nije statistički signifikantna te je koncentracija prometrina u krvi podjednaka i u muškom i u ženskom organizmu i slijedi sličnu dinamiku eliminacije. S obzirom na prije spomenute



rezultate dobivene na štakoru ovi rezultati predstavljaju značajan doprinos spoznajama o toksikodinamici prometrina. Rezultati ukazuju na zaključak da različite vrste organizama imaju različitu spolom uvjetovanu toksikodinamiku. Slični primjeri razlika u toksičnosti poznati su i prije za različite ksenobiotike poput primjerice talidomidne katastrofe u šezdesetim godinama prošlog stoljeća a kada su predklinička testiranja talidomida provedena samo na jednoj vrsti životinja, a nakon kliničke u trudnica rezultat je bio velik broj teratodeformirane novorođenčadi. Razlike u apsorpciji i biotransformaciji prometrina između spolova poznate su za druge spojeve od kojih bi najpoznatiji primjer bio razlika apsorpcije i biotransformacije etilnog alkohola u različitim spolovima. Zbog interspecijske razlike u toksikodinamici i bioretenciji prometrina spoja pokusi toksičnosti moraju se provoditi na nekoliko modela i to obavezno na oba spola, prije ekstrapolacije rezultata na čovjeka.

## 5. ZAKLJUČAK

Istraživanjem toksikodinamike prometrina u krvi miša utvrđeno je da se male koncentracije prometrina mogu naći u krvi i nakon 24h od oralne aplikacije tog herbicida. Iako se u oba spola koncentracija smanjuje s obzirom na vrijeme od aplikacije prometrina, uočene su i određene razlike između spolovima miševa. Statistički značajne razlike između mužjaka i ženki postoje do 4 sata od aplikacije prometrina sa zabilježenim višim koncentracijama kod mužjaka. Nakon 4 sata se smanjenje prometrina u krvi miševa ujednažuje u oba spola. Budući da se prometrin u potpunosti ne eliminira nego ostaje prisutan i nakon 24h u krvi, to može ukazivati na njegovo potencijalno nakupljanje i povećanje biodostupne koncentracije u organizmu kod dulje izloženosti tom spoju.

## **6. LITERATURA**

**Albanis T.A., Danis T.G., Kourgia M.K. (1994):** Transportation of pesticides in estuaries of the Axios, Loudias and Aliakmon rivers (Thermaikos Gulf), Greece. *Sci. Total Environ.* 156, 11–22.

**Ashton F.M., Crafts A.S. (1973):** Mode of Action of Herbicides. Wiley, N.Y.

**Ayele J., Levavasseur P., Mazet M. (1996):** Adsorption de triazines sur charbon actif en poudre. *Journal Water-SRT Aqua* (45) 28

**AZO - Agencija za zaštitu okoliša (2005):** <http://www.azo.hr/>

**Balduini L., Matoga M., Cavalli E., Seilles E., Riethmuller D., Thomassin M., Guillaume Y.C. (2003):** Triazinic herbicide determination by gas chromatography–mass spectrometry in breast milk. *J. Chromatogr. B* 794, 389–395.

**Barcelo D. (1993):** Environmental protectionagency and other methods for the determination of priority pesticides and their transformates on products in water. *J. Chromatogr.* 643, 117-143.

**Berg M., Müller S.R., Schwarzenbach R.P. (1995):** Simultaneous determination of triazines including atrazine and their major metabolites hydroxyatrazine, desethylatrazine, and deisopropylatrazine in natural waters. *Analytical Chemistry* 67: (11), 1860 -1865.

**Bezuglov V.G., Minenko A.K., Postoeva R.A. (1976):** Herbicides in crop rotation and soil microflora. *Khim. Sel. Khoz* 14: (12), 45-49.

**Böcher M., Sorensen K. (1994):** Direct coupling of an atrazine analogue to microtiter plates for a competitive immunoassays for s-triazines. *Food and Agricultural Immunology* 6: 155-161.

**Brvar M., Okrajsek R., Kosmina P., Staric F., Kaps R., Kozelj G., Bunc M. (2008):** Metabolic acidosis in prometryn (triazine herbicide) self-poisoning. *Clinical Toxicology: The Official Journal of the American Academy of Clinical Toxicology & European Association of Poisons Centres & Clinical Toxicologists.* 46(3):270-3.

**iki D. (2006):** U inak prometrina na odnose serumskih i tkivnih enzimskih biomarkera u miša : doktorska disertacija. Sveu ilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matemati ki fakultet, Biološki odsjek. Središnja biološka knjižnica.

**Bukvi V. (2006):** Ostaci teških metala i pesticida u vodi, sedimentu i tkivima riba delte Neretve. Doktorska disertacija. Sveu ilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matemati ki fakultet, Biološki odsjek. Središnja biološka knjižnica.

**Enger E.D., Smith B.F. (2002):** Environmental science: a study of interrelationships, eighth edition. McGraw-Hill Companies Inc.

**Evgenidou E., Bizani E., Christophoridis C., Fytianos K. (2007): Heterogeneous photocatalytic degradation of prometryn in aqueous solutions under UV–Vis irradiation. Chemosphere (68) 1877–1882**

**Fichtl B. (1999): Principles of toxicokinetics. Marquardt H, Schäfer SG, McClellan RO, Welsch F (eds). Toxicology. San Diego, CA: Academic Press; str. 43-82.**

**Frankovi M. (1990): U inak hormonskog herbicida 2,4-D (2,4-diklorfenoksiocetna kiselina) na enzimatsku aktivnost u štakora. Zavod za animalnu fiziologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matemati kog fakulteta, Sveu ilišta u Zagrebu. Zagreb. 63**

**Galvin R.M., Rodríguez Mellado J.M., Higuera M.J., Ruiz Montoya M. (2001): Bulletin of Electrochem. (17) 49**

**Galvin R.M., Rodriguez Mellado J.M., Higuera M.J. (2002): Reductive deactivation of some s-triazine herbicides: prometryne, desmetryne and terbutryne. J.Serb.Chem.Soc. 67(6)381-392**

**Ghinea E., Simionescu L., Oprescu M. (1980): Studies on the action of pesticides upon the endocrines using in vitro human thyroid cells culture and in vivo animal models. II. Herbicides-prometrin and terbutrin. Endocrinologie. 18(3):167-73.**

**Glasilo biljne zaštite - glasilo sekcije za biljnu zaštitu Hrvatskog agronomskog društva 2-3, (2005): 123-125. Zadružna štampa d.d., Zagreb.**

**Gospodarski list (2007):  
<http://www.gospodarski-list.hr/clanak.aspx?cID=493&refID=15042007>**

**Guyton A.C., Hall J.E. (2003): Medicinska fiziologija, deseto izdanje, Medicinska naklada Zagreb**

**Gzhegotskii M.I. (1968): Changes in the peripheral blood under the acute and chronic action of anti-Gramineae herbicides which act via the roots. Gigiena Truda i Prof. Zabolovaniya 12: (12) 42-43**

**Hayes W.J., Laws J.R. (1991): Handbook of Pesticide Toxicology, Academic Press, San Diego, CA, ZDA, pp 1380–1389**

**Herbos (2005): [www.herbos.hr](http://www.herbos.hr)**

**Hodgson E., Lefi P.E. (1996): Enviroment Health Perspectives, 104, 97.**

**Hörmann W.D., Tourmayre J.C., Egli H. (1979): Pesticides Monitoring Journal, 13, 128.**

**Hu X., Hu Y., Li G. (2007): Development of novel molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber and its application for the determination of triazines in complicated samples coupled with high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1147. 1–9**

**Jordan M, Rzehak K, Maryanska A. (1977): The Effect of Two Pesticides, Miedzian 50 and Gesagard 50, on the Development of Tadpoles of Rana temporaria**

**Lewis R., Gaffin D., Hoefnagels M., Parker B. (2004): Life, fifth edition. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York.**

**Martynyuk V.Z., Gzhegotskii M.I., Shtabskii B.M. (1970): A sanitary-toxicological characterization of the herbicide Prometryne. Fakt Vneshn Sredy Znachenie Zdorov'ya Nase (2): 64-69.**

**McGraw-Hill Encyclopedia of Science and Technology, 5th edition, published by The McGraw-Hill Companies, Inc**

**Muthmann R., Nadin P. (2007): Eurostat statistical books. Office for Official Publications of the European Communities, ISBN 92-79-03890-7. Catalogue number: KS-76-06-669-EN-N**

**Navarro S., Vela N., Gimenez M.J., Navarro G. (2004): Effect of temperature on the disappearance of four triazine herbicides in environmental waters. Chemosphere (57) 51–59**

**NRC - National Research Council (1987): Regulating Pesticides in Food. National Academy Press, Washington, D.C.**

**Papadopoulou-Mourkidou E., Karpouzas D.G., Patsias J., Kotopoulou A., Milothridou A., Kintzikoglou K., Vlachou P. (2004): The potential of pesticides to contaminate the groundwater resources of the Axios river basin. Part II. Monitoring study in the south part of the basin. Sci. Total Environ. 321, 147–164.**

**Peterson D.E., Thompson C.R., Regehr D.L., Al-Khatib K. (2001): Herbicide Mode of Action, Kansas State University, Kansas State University Agr**

**PRC (2008): Pesticides residue committee. Pesticide residues monitoring report [www.prc-uk.org](http://www.prc-uk.org)**

**PSD (Pesticide safety directive) (2003): <http://www.pesticides.gov.uk/>**

**Shtabskiy B.M. (1976): Cumulative properties and gonadotoxic effects of chemical substances. Gig. Sanit. 41 (1): 82-84.**

**Springer O.P. (2000): Effect of herbicide atrazine on immuno-haematopoietic organs in mice. Exp. Tox, 76:81**

**Springer O.P., Springer D. (2008): Otrovani modrozeleni planet. Priru mik iz ekologije, ekotoksikologije i zaštite prirode i okoliša. Meridijani Samobor.**

**Swann R.L., Laskowski D.A., McCall P.J., Kuy K.V. (1983): A rapid method for the estimation of the environmental parameters of octanol/ water partition coefficient, soil sorption constant, water to air ratio, and water solubility. Res. Rev. 85, 17–28.**

**Thiruchelvam M., Brockel B.J., Richfield E.K., Baggs R.B., Cory-Slechta D.A. (2000): Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson disease. Brain Research 873: 225-234 a.**

**Ulm L. (1994): U inak prenatalne i postnatalne ekspozicije herbicida 2,4-D na imunohematopoetski sustav miša. Magistarski rad, Zavod za animalnu fiziologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matemati kog fakulteta, Sveu ilišta u Zagrebu. Zagreb.**

**Wallace-Hayes A. (2001): Principles and Methods of Toxicology. Taylor & Francis, Int. (ed) 77-137, 243-285, 285-365, 917-959, 1415-1451.**

**Williams K.D., Maneke J..D., AbdelHameed M., Hall R., Palmer T.E., Kitano M., Hidaka T. (1999): 52-week oral gavage chronic toxicity study with ubiquinone in rats with 4 week recovery. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47, 3756-3763**

**Worthing R.C. (1991): The pesticide manual, 9<sup>th</sup> ed., British Crop Protection Council, Surrey (U.K.).**

**Vida ek Ž., Racz Z., Husnjak S. (1994): Kontrola drenaže, tla i voda u slivu Karašice i Vu ice. Hrvatska vodoprivreda, god. III., br. 21/22, str. 15-17**